UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CÍNTIA MAIRA PEREIRA DA SILVA

KBDM como ferramenta para processamento de sinais de
Espectroscopia por Ressonância Magnética

São Carlos
2013

CÍNTIA MAIRA PEREIRA DA SILVA

KBDM como ferramenta para processamento de sinais de
Espectroscopia por Ressonância Magnética

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Computacional
Orientador: Prof. Dr. Alberto Tannús

Versão Original

São Carlos
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pereira da Silva, Cíntia Maira

KBDM como ferramenta para processamento de sinais
de espectroscopia por Ressonância Magnética / Cíntia
Maira Pereira da Silva; orientador Alberto Tannús --
São Carlos, 2013.
161 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Computacional) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Espectroscopia por ressonância magnética de ^1H
in vivo. . 2. Método de diagonalização na base de
Krillov. 3. KBDM . 4. Método de diagonalização
filtrada. 5. Processamento de sinal digital. I.
Tannús, Alberto , orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cíntia Maira Pereira da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Computacional.

Aprovado(a) em: 04/12/2013

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Alberto Tannus
Instituição: (IFSC/USP)

Prof(a). Dr(a). Carlos Ernesto Garrido Salmon
Instituição: (FFCLRP/USP)

Prof(a). Dr(a). Jose Pedro Donoso Gonzalez
Instituição: (IFSC/USP)

Dedico aos meus pais, que são grandes exemplos de luta, perseverança e conquista, além de serem os pilares da minha vida. E ao meu namorado, pela compreensão e apoio, traduzidos em almoços, jantares, cafés e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Alberto Tannús pela proposta do projeto realizado, orientação, paciência e conhecimento transmitido. E à sua mulher Nelma pelas várias pizzadas.

Aos professores que considero meus coorientadores: o prof. Dr. Fernando F. Paiva, pelas importantes discussões e ensinamentos que contribuíram demasiadamente para o meu crescimento científico, e o prof. Dr. Cláudio J. Magon, que implementou o método utilizado, e sempre dispôs a esclarecer as dúvidas referentes.

A todos os colegas e amigos do CIERMag que tanto me ajudaram e aconselharam durante todo o trabalho, especialmente o Dr. Edson L. G. Vidoto e a futura mãe Jackeline Malheiros.

À minha linda família, ao meu namorado Dionísio e aos meus grandes amigos de Ribeirão Preto, Itajubá e São Carlos, que sem o suporte, a compreensão, o estímulo e o amor destes, não teria conseguido finalizar com sucesso este trabalho.

Aos meus queridos professores e colegas da física médica da USP - RP, que tanto colaboraram para a minha formação profissional e pessoal. Em especial ao prof. Dr. Carlos E. Garrido Salmon, que foi quem me introduziu com excelência ao deslumbrante mundo da ressonância, e que intermediou, para este trabalho, o acesso ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. E, também, ao seu aluno e meu amigo Felipe Barreto, pelas discussões esclarecedoras, pela enorme disposição e ânimo em sempre me ajudar.

Ao grupo de Polímeros e de Biofísica Molecular por colocarem à minha disposição os seus respectivos laboratórios. Em especial, aos técnicos destes grupos: Bruno B. Millan, Debora T. Balogh e Derminda Isabel de Moraes, por se disponibilizarem a responder minhas dúvidas experimentais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

RESUMO

SILVA, C. M. P. **KBDM como ferramenta para processamento de sinais de espectroscopia por Ressonância Magnética**. 2013. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

A precisão e acurácia dos métodos mais utilizados atualmente de processamento de dados de espectroscopia por Ressonância Magnética (MRS), baseados na Transformada de Fourier (FT), requerem supressão apropriada (o que está longe de ser trivial) e aquisições longas para a obtenção de alta resolução espectral. Além disso, a FT tem dificuldades quando faltam dados no domínio de tempo, como, por exemplo, pela redução do tempo de aquisição, e consequente número de pontos adquiridos. Isto pode ocorrer, também, por artefatos na aquisição ou, ainda, seja pela exclusão intencional dos primeiros pontos do sinal para a eliminação de ressonâncias largas que estão distorcendo a linha de base no domínio da frequência. Neste estudo, propomos a utilização do Método de Diagonalização na Base de Krylov (KBDM) como uma alternativa a FT para algumas de suas limitações. O método ajusta sinais de experimentos de *Free Induction Decay* (FID) por uma soma de funções harmônicas complexas, amortecidas exponencialmente, permitindo uma fácil manipulação dos seus parâmetros de caracterização. O KBDM é numericamente mais efetivo para análise de sinais truncados e tem diversos recursos que possibilitam remover picos de forma mais eficiente, como por exemplo, o pico residual da água. Além disso, foi introduzida a possibilidade de quantificação de dados de MRS com o método. Para avaliar a sensibilidade, eficiência e reprodutibilidade do método para quantificar e analisar sinais truncados, foi proposto fazer simulações de espectros clínicos e experimentos em *phantoms* que representassem o ambiente metabólico do cérebro, para MRS de próton de diferentes níveis de ruídos e para pequenas variações do N-acetil aspartato (NAA). Com estes estudos pôde se comprovar a viabilidade do método para processar dados de MRS e verificar seu potencial na complementação das técnicas atualmente empregadas, especialmente quando uma resolução espectral e temporal maior que o limite imposto pela Relação de Incerteza do formalismo de Fourier é necessária. Além disso, uma desejável facilidade de manipulação de picos específicos (por exemplo, exclusão e quantificação) é proporcionada pelo método. Como perspectivas animadoras deste trabalho esperamos a introdução do KBDM como uma técnica

eficiente e coadjuvante ao Imageamento de Ressonância Magnética funcional (fMRI), auxiliando estudos de funções cerebrais, em sequências de MRS para identificar uma rápida variação das linhas associadas as atividades metabólicas dos cérebros.

Palavras-chave: Espectroscopia por ressonância magnética de ^1H *in vivo*. Método de diagonalização na base de Krilov. KBDM. Método de diagonalização filtrada. FDM. Processamento de sinal digital. Domínio do tempo. Quantificação.

ABSTRACT

SILVA, C. M. P. **KBDM as a tool for Magnetic Resonance spectroscopy signal processing**. 2013. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

The precision and accuracy of the most widely used methods to perform Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) data processing based on the Fourier Transform (FT), require appropriate suppression (which is far from trivial) and long acquisitions to obtain high spectral resolution. Furthermore, FT poses difficulty when there are missing data in the time domain. This occurs because of reduction of the acquisition time and consequently also in the number of acquired points, or because of artifacts during acquisition, or even intentional exclusion of the first signal points for the elimination of broad resonances that are producing the distorted baseline in the frequency domain. In this study, we propose the use of the Krylov Basis Diagonalization Method (KBDM) formalism as an alternative to some of FT limitations. The method adjusts signals of Free Induction Decay (FID) experiments with a sum of complex harmonic functions, exponentially damped, allowing easy manipulation of its characterization parameters. The KBDM is numerically more effective for truncated signal analysis and has several features that make it possible to remove peaks more efficiently, such as the residual water peak. Moreover, we introduced the possibility of quantification of MRS data with the described method. To evaluate the sensitivity, efficiency and reproducibility of the method for quantifying and analyzing truncated signals, and through the clinical spectra simulations and experiments in phantoms that would represent the brain metabolic environment, we proposed to perform proton MRS at different noise levels and with small variations of N- acetyl aspartate (NAA) metabolite. These studies allowed to prove the feasibility of the method to process MRS data and verified its potential in complementing techniques currently employed, especially when a greater temporal and spectral resolution is required, more than the limit imposed by the Uncertainty Relation of FT formalism. Furthermore, it is also a desirable effortless tool of handling specific peaks (e.g., exclusion and quantification). Exciting prospects from this work include the introduction of KBDM as an efficient and adjuvant technique to functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI), for studying the brain functions, in MRS sequence to identify rapid variation in spectroscopic lines associated to metabolic activities in the brain.

Keywords: In vivo ^1H magnetic resonance spectroscopy. Krylov basis diagonalization method. KBDM. Filter diagonalization method, FDM. Digital signal processing. Time domain. Quantification.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - A influência do campo magnético externo B_0 na diferença entre os níveis de energia Zeeman para um sistema de spin $\frac{1}{2}$ e razão giromagnética positiva.....34
- Figura 2 - Movimento de precessão de um momento magnético μ em torno do campo magnético constante B_036
- Figura 3 - (a) Diagrama comparativo entre o Sistema de Coordenadas Girante $x' y' z'$, de velocidade angular Ω , com a do Laboratório ($x y z$). (b) e (c) Representam a magnetização total sob um campo magnético estático B_0 num sistema CG e CL, respectivamente.....39
- Figura 4 - Evolução da magnetização total sob um campo magnético estático após aplicação de pulsos de RF com diferentes durações. Comparam-se dois sistemas de coordenadas: CL (à esquerda) e CG (à direita), cuja frequência de rotação é igual à frequência de ressonância. Os pulsos de RF são: (a) 45° (b) 90° e (c) 180°42
- Figura 5 - Diagrama da relaxação transversal. Representação do comportamento de um sistema de spins nucleares μ_i , e a magnetização longitudinal (ML) e a magnetização transversal (MT), sob um campo magnético estático B_0 , no decorrer de uma sequência de eventos: (a) Inicialmente: ML máxima e MT nula. (b) Aplicação de um pulso de 90° (ML nula e MT máxima). (c) Após certo tempo, as isocromatas já apresentam alguma dispersão entre si (referencial CG), acarretando na diminuição da MT. (d) Após um período maior, o sistema ainda não retornou ao equilíbrio (ML < M_0), mas o sistema já relaxou completamente no plano transversal, portanto $T_2 < T_1$44
- Figura 6 - Evolução da Magnetização transversal (MT), linha azul, e longitudinal (ML), linha vermelha, após a aplicação de um pulso de excitação.....45
- Figura 7 – Simulação de FIDs diferentes e o respectivo espectro do FID resultante. Dados da simulação: FID/Pico 1: Amplitude (A) = 1 u.a., frequência(f) = 384 Hz, $T_2 = t = 0,011$ s; FID/Pico 2: A: 2 u.a., f= 256 Hz, $T_2 = 3t$ e FID/Pico 3: A = 2,85 u.a., f = 128 Hz, $T_2 = 6t$. Todos os picos possuem fase inicial nula. (a) FID de três sistemas de spins distintos. Apresentados de forma individual (três primeiros gráficos) e o último, composto pela mistura dos três. (b) FT do último FID (composição de 3 sistemas diferentes de spins).49
- Figura 8 – Representação gráfica da evolução do FID e formação do eco (figura inferior) a partir da aplicação de um pulso RF de 90° e 180° , separados temporalmente por τ (figura superior). O gráfico do FID está descrevendo a relaxação transversal com T_2 (em CG), linha pontilhada, e T_2^* (em CG, linha azul, e CL, linha vermelha).51

Figura 9 – Influência da densidade eletrônica na blindagem do núcleo de hidrogênio em ambientes químicos distintos: (a) Maior presença eletrônica e, conseqüentemente, maior blindagem (Bsh) e menor campo efetivo (Beff) sobre o núcleo. (b) Devido a uma maior eletronegatividade do oxigênio, há uma menor blindagem eletrônica sobre o ^1H e conseqüentemente Beff é maior e Bsh, menor.	55
Figura 10 – Espectro de RM de próton do lactato simulado pelo NMR Scope do jMRUI 5.0 ²² como MRS de próton. Está representada apenas a magnitude absoluta. Dados: TE = 36ms, campo 3T, banda de 2KHz.	57
Figura 11 – Interação spin-spin entre os átomos X e Y. (a) Átomos isolados, em que o Contato de Fermi favorece energeticamente a orientação antiparalela entre o spin nuclear e o eletrônico em ambos os átomos. (b) Ligação covalente entre X e Y, com acoplamento escalar.	59
Figura 12 - Níveis de energia de um sistema XY. Os quatro níveis sem acoplamento (à esquerda) e com acoplamento spin-spin positivo (à direita). (a) As transições energéticas $\alpha \rightarrow \beta$ de X ou Y, em um sistema com acoplamento, podem ser mais favoráveis energeticamente ou menos, levando a quatro ressonâncias distintas. (b) Em um sistema sem acoplamento, há apenas duas intensidades diferentes de ressonância, uma correspondente a X e outra a Y.	60
Figura 13 – Inicialmente estão representados os espectros de dois átomos, X e Y, não acoplados. Logo abaixo está a representação do espectro quando ocorre o acoplamento escalar entre X e Y. Há uma divisão dos singletos das ressonâncias destes átomos em dubletos, que são separados pela constante J. As ressonâncias, nas frequências mais baixas e mais altas para os dois átomos, são associadas com transições energéticas, em que o spin nuclear do átomo que se acopla, pode assumir o estado de spin α ou β . Um exemplo de átomos acoplados X e Y é o acoplamento escalar do ^{13}C com o ^1H	60
Figura 14 - (a) À esquerda, a representação das relações entre as intensidades das multiplicidades de um pico em um Triângulo de Pascal (coeficientes da distribuição binomial). Ao lado, há a correspondência de cada uma das linhas do Triângulo com a estrutura molecular que a gera, sendo A acoplado indiretamente ao(s) átomo(s) X, e todos com núcleos magneticamente equivalentes, além do nome dado ao número de linhas desdobradas. (b) Molécula de etanol com seu respectivo espectro. O espectro evidencia o acoplamento dos prótons equivalentes do metileno com os do metil.	62
Figura 15- Exemplo de espectro de ^1H MRS in vivo de um cérebro de rato em 11,75 T (TR/TE=4000/12 ms). Figura adaptada ²¹	66
Figura 16 – Diagrama de fluxo contendo as etapas para o processamento e quantificação dos dados.	70

Figura 17 Diagrama da sequência de pulsos de RF e gradientes utilizados para localização 3D do método PRESS. Ao aplicar um pulso de RF e um gradiente simultaneamente, excita-se spins (pulso de 90) ou refocaliza-se os spins já excitados (pulso de 180) pertencentes ao plano que intersecta a direção do gradiente. (b) As cores verde, azul e vermelho, identificam regiões em que os spins são excitados ou refocalizados pelos pulsos de RF aplicados paralelamente com gradientes nas direções x, y e z, respectivamente. Ilustrando, assim, cada fase do processo de seleção. A região vermelha corresponde ao <i>voxel</i> final (intersecção dos três planos), aonde será formado um eco de spins após um TE, induzindo um FID na bobina receptora.	73
Figura 18 - FID ideal em que a sua FT produz uma parte real absorptiva, e uma parte imaginária dispersiva.	78
Figura 19 – FIDs processados pela FT para compreensão dos efeitos de truncamento. (a) Simulação de um FID formado pela sobreposição de dois, cujas frequências são de 4.9 e 5.0 Hz; amortecimento: $1/\gamma = 10.0$; <i>dwell time</i> = 0.06 s. O sinal em preto é o FID completo (simulado todos os pontos até seu relaxamento completo). O FID vermelho é o original truncado em 12,5% do tamanho inicial. Já o azul é idêntico ao vermelho, mas com preenchimento de zeros até 1024 pontos, a fim de melhorar a interpolação. (b) É possível visualizar as linhas alargadas e em sobreposição no espectro vermelho, devido à Relação de Incerteza do formalismo de Fourier e, no azul, as oscilações de Gibbs. Em ambos, é impossível resolver o dubleto observado no espectro preto.	81
Figura 20 – Espectro gerado a partir de todos os parâmetros da tabela 2, com auxílio do método KBDM para a construção espectral. Apenas o NAAG não foi identificado devido à dificuldade de fazê-lo visualmente, por ele está sob o NAA.	108
Figura 21 – Espectros de diferentes truncamentos do dado simulado. (a) FID com marcações indicando onde foram feitos os truncamentos do número de pontos para os diferentes processamentos utilizando o KBDM. (b) Espectros feitos a partir de truncamentos decrescentes do mesmo FID. Para referência, foi incluído o espectro obtido utilizando o formalismo de Fourier aplicado ao sinal completo. Foi feito truncamento até a perda de informação (64 pontos).	109
Figura 22 – Comparação entre a FT e o KBDM para um FID simulado com truncamento nos 80 pontos iniciais, em FID de tamanho original de 2048 pontos. Para melhor avaliar a baixa resolução e artefatos, como as oscilações de Gibbs, foi também retratada a FT de um FID com preenchimento de zeros, resultando em 2048 pontos (1968 zeros no final). O preenchimento possibilita uma melhor interpolação do espectro e, conseqüentemente, melhor definição dos picos e artefatos gerados pelo truncamento.	111

Figura 23 – Para um espectro sem ruído, truncado em 1000 pontos, o KBDM ajusta 500 picos, dentre estes, apenas 16 significantes e que correspondem aos picos genuínos (ampliado no quadrante superior).	112
Figura 24 – Espectros simulados com diferentes níveis de ruído: (a) com o RMS do ruído de $2,3E-5$ (valor experimental médio dos espectros adquiridos de <i>phantoms</i> com o sistema de 2 T), (b) $1E-4$ e (c) $5E-4$	114
Figura 25 – Média das amplitudes dos principais picos dos metabólitos de maior aplicação clínica, extraídas dos dez espectros simulados, em função do RMS do ruído.	115
Figura 26 - Quantificação do pico NAA em função do nível de ruído, para os valores originais de concentração, com aumento de 5% do NAA e 10%. Todos os valores foram normalizados para 100.	117
Figura 27 - <i>Phantoms</i> de PVC, que denominamos tipo A, desenvolvidos para o experimento.	122
Figura 28 - <i>Phantom</i> A inserido na bobina.	123
Figura 29 - <i>Phantoms</i> de vidro, tipo B, capacidade de 250 ml cada.	123
Figura 30 – Espectros adquiridos do PhA0 com o Protocolo 1 processados por (a) FT (b) KBDM	127
Figura 31 – Espectros adquiridos do PhB0 com o Protocolo 2 processados por (a) FT (b) KBDM	128
Figura 32 – Indicação de alguns pontos espúrios após processamento pelo KBDM dos FIDs correspondentes do: (a) Espectro 6, Protocolo 1 (b) Espectro 1, Protocolo 2.	130
Figura 33 – (a) Indicações no FID das posições em que foram feitos os truncamentos. (b) Os espectros gerados pelo KBDM pelos FID com diferentes truncamentos, comparados ao gerado pela FT do FID completo.	132
Figura 34 - Espectros analisados pelo KBDM, do PhA0, original. O pico residual da água se encontra por volta de 4,7 ppm e é aproximadamente 17 vezes maior que o maior pico dos metabólitos (NAA).	135
Figura 35 - Lista de todos os picos determinados pelos método, com suas respectivas amplitudes e desvios químicos. O quadrante superior mostra os valores obtidos que compõem o pico da água.	135
Figura 36 - Espectro original mostrado em verde, a linha da água na cor preta - determinada a partir dos picos selecionados na figura anterior, e o espectro remanescente (vermelho) - após a remoção do pico residual da água.	136

Figura 37 – Espectro adquirido com Protocolo 01 sem pulso de supressão da água, para o <i>phantom</i> PhA0. O quadrante superior amplia a região dos metabólitos para mostrar a superposição deles com a água.	138
Figura 38 – Remoção da água ao fitar apenas as lorentzianas cuja amplitude fosse menor que a amplitude do pico do NAA. E após isto foi processado os dados com o KBDM.	139
Figura 39 – Componente real de um FID adquirido pelo Protocolo 2 do PhB0, com NSA 128 médias em duas etapas: (a) FID original com marcação em 1500 pontos, onde foi feito o primeiro truncamento. (b) FID dos metabólitos com a marcação do truncamento em 1000 pontos– após o processamento por KBDM do sinal de (a), foi retirada o sinal residual da água e a partir das linhas remanescentes, reconstruído o FID que contém essencialmente só as componentes metabólicas.	140
Figura 40 – Exemplo de espectros adquiridos com o Protocolo 2 para o <i>phantom</i> PhB0 com o menor valor de NSA, 16, e o maior, NSA de 128, ambos foram preenchidos de zeros (FID com tamanho total de 5000 pontos) e processados com a FT.....	141
Figura 41 – Espectros gerados pelo KBDM e FT a partir de um mesmo FID, obtido com o Protocolo 2 e 16 médias, do <i>phantom</i> PhB0. Para o processamento do KBDM foi realizado um truncamento nos 1500 pontos iniciais e depois removido o pico da água, e, posteriormente, outro truncamento de 1000 pontos no FID remanescente.	142
Figura 42 – Exemplos de espectros com diferentes SNR processados com a FT com o FID com preenchimento de zeros (tamanho final 5000 pontos), superpostos com o ajuste dos picos do NAA, 2,0 ppm e Cr, em 3,03 ppm, feitos pelo KBDM, e o resíduo. Cada resíduo, apresentado também com 5000 pontos, foi calculado como a diferença entre o espectro gerado pelo KBDM, que não foi mostrado, e os ajustes do NAA e Cr.....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades de RM comumente encontrada em núcleos de estruturas <i>in vivo</i> . Está enfatizado o ^1H por ser o de maior concentração no corpo e o mais sensível para aplicações de RM.....	64
Tabela 2 – Parâmetros dos principais picos dos metabólitos cerebrais e também de picos não desejados, mas que frequentemente aparecem em espectros <i>in vivo</i> (como lipídios, por exemplo) de um espectro clínico de humanos obtido em um campo de 3T.....	107
Tabela 3 – Valores utilizados para selecionar as lorentzianas que ajustam os picos que gostaríamos de quantificar. A frequência corresponde o valor central de frequência do intervalo (d).....	115
Tabela 4 - Quantificação feita do NAA pelo KBDM em espectros simulados com pequenas variações de concentração com o RMS similar ao ruído experimental (RMS de $2,3\text{E}-5$).....	118
Tabela 5 - Concentrações molares dos metabólitos para a matéria cinzenta do lóbulo Parietal humano em um campo de 2.0 T^{111}	121
Tabela 6 - Concentração de algumas substâncias utilizadas no phantom: solução tampão, marcadores e NaN_3	121
Tabela 7 – SNR médio e seu desvio padrão para os 5 espectros adquiridos para cada NSA.....	142
Tabela 8 – Relação entre as quantificações dos picos de 2,0 ppm do NAA e 3,03 da Cr dos espectros gerados com diferentes SNR (associada diretamente à variação do NSA) do PhB0 com Protocolo 2 com o KBDM.	145
Tabela 9 – <i>Prior knowledge</i> utilizado para o ajuste pelo AMARES do NAA e Cr. Ele consiste nos valores iniciais de <i>chemical shift</i> e FWHM e os intervalos destes parâmetros que são dados como restrições leves (<i>soft constraints</i>).	146
Tabela 10 – As áreas do principal pico do NAA para experimentos feitos com o Protocolo 2 nos <i>phantoms</i> (tipo B) que apresentavam variação na concentração do NAA. Os ajustes do pico, para o cálculo da área, foram feitos pelo AMARES e pelo KBDM.....	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMARES	<i>Advanced Method for Accurate, Robust, and Efficient Spectral fitting</i>
CG	Sistema de Coordenadas Girantes
CHESS	Chemically Selective Saturation
CL	Sistema de Coordenadas do Laboratório
Cho	Colina
Cr	Creatina
DFT	Transformada Discreta de Fourier
FID	Free Induction Decay
FFT	Transformada Rápida de Fourier
fMRI	functional Magnetic Resonance Imaging
FT	Transformada de Fourier
FWHM	Largura à meia altura
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
HLSVD	Hankel Lanczos Singular Value Decomposition
HSVD	Hankel Singular Value Decomposition
HTLS	Hankel Total Least Squares
ISIS	Image Selected In Vivo Spectroscopy
Lac	Lactato
LCModel	Linear Combination of Model spectra
LPSVD	Linear Predictive Singular Value Decomposition
M-Ins	Mio-Inositol
MRS	Magnetic Resonance Spectroscopy
MRSI	Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging
NAA	N-acetil aspartato
NAAG	N-acetilaspartilglutamato
NSA	Number of signal averages
OVS	Outer Volume Suppression
PRESS	Point Resolved Spectroscopy
QUEST	quantitation based on QUantum ESTimation
RD	Resolução espectral Digital

RF	Radiofrequência
RM	Ressonância Magnética
RMS	Root Mean Square
SNR	Signal-to-Noise Ratio
STEAM	Stimulated Echo Acquisition Mode
SVS	Single Voxel Spectroscopy
SVD	Singular Value Decomposition
TA	Tempo de Aquisição
TE	Tempo ao Eco
TR	Tempo de Repetição
VAPOR	Variable pulse power and optimized relaxation delays
VOI	Volume de Interesse

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	PRINCÍPIOS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	31
2.1	Propriedades Magnéticas do Núcleo Atômico	31
2.2	Efeito Zeeman.....	33
2.3	Visão Clássica da Magnetização	35
2.4	Sistema de Coordenadas Girantes	39
2.5	Aplicação pulso RF	40
2.6	Processos de Relaxação e Equações de Bloch.....	43
2.7	Do Sinal de RM ao Espectro	46
2.8	Eco de Spins	50
3	ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.....	53
3.1	Chemical Shift	54
3.2	Acoplamento escalar.....	58
3.3	MRS <i>in vivo</i>	62
3.3.1	Desafios da técnica	67
3.4	Quantificação espectral.....	68
3.4.1	Aquisição dos dados	70
3.4.2	Transformada de Fourier	77
3.4.3	Pré-processamento dos dados.....	82
3.4.4	Processamento dos dados	89
4	KBDM.....	97
4.1	Problema da Inversão Harmônica	97
4.2	KBDM: Solução simples para a HIP	98
4.3	Construindo o Espectro	101
5	PROCESSAMENTO DE SINAIS DE MRS DE ^1H PELO KBDM.....	103
5.1	Quantificação por KBDM	103
5.2	Simulações Espectrais	106
5.3	Análises Experimentais	118
5.3.1	Materiais e Métodos	118
5.3.2	Resultados e Discussões	125

6	CONCLUSÃO.....	147
	REFERÊNCIAS.....	151

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos a espectroscopia por ressonância magnética (MRS, *Magnetic Resonance Spectroscopy*) *in vivo* vem provando ser uma poderosa ferramenta não invasiva na pesquisa biomédica e nos diagnósticos clínicos. O processamento do sinal da aquisição é uma de suas etapas essenciais por possibilitar a quantificação das concentrações dos metabólitos, que são utilizados para análises bioquímicas, fisiológicas ou morfológicas dos tecidos tanto em condições normais quanto patológicas. A quantificação é, portanto, a chave para estudos bem sucedidos de MRS *in vivo*.

A maioria das pesquisas em metodologia de MRS foca somente no aprimoramento das técnicas de aquisição com o objetivo de facilitar a quantificação do sistema de interesse, tais como a otimização dos parâmetros das sequências de pulsos para alcançar uma melhor localização e sensibilidade. Entretanto, a associação de métodos de processamentos de sinais mais eficientes e que ajustem melhor os picos de interesse, conforme as especificações do experimento de Ressonância Magnética (RM), trazem quantificações mais confiáveis, precisas e acuradas.

Os processamentos podem variar da aplicação da simples Transformada de Fourier (FT, *Fourier Transform*) e inspeção visual de espectros de RM, à aplicação de abordagens matemáticas altamente avançadas. Recentemente, um método não linear, que era originalmente aplicado em sistemas quânticos de grande dimensão, vem sendo aplicado para a análise espectral de alta resolução de sinais no domínio do tempo, conhecido como Método de diagonalização na base de Krilov (KBDM, *Krylov Basis Diagonalization Method*)¹. O seu formalismo tem sido empregado em diversas áreas, entre elas, em alguns problemas específicos de processamento de dados de RM¹⁻³ com sucesso.

Ele é capaz de extrair parâmetros espectrais (frequências, larguras de linhas, amplitudes e fases) diretamente do sinal no domínio do tempo, ajustando-o a uma soma de senóides complexas amortecidas. O KBDM tem vantagens computacionalmente práticas em relação à velocidade, à estabilidade, à capacidade de processar eficientemente sinais temporais muito longos com muitas características espectrais e, de forma direta, sinais multidimensionais.

Na literatura, há poucos estudos sobre o formalismo do KBDM, e dentre os que existem, a maioria aborda um algoritmo similar, o Método de diagonalização filtrada (FDM, *Filter Diagonalization Method*)^{1,4}, cuja diferença está na implementação de filtros de Fourier

para quebrar a análise espectral em pequenas janelas, de forma a reduzir consideravelmente o tempo do processamento de dados muito grandes (milhares de pontos). Os dois métodos possuem formalismos matemáticos equivalentes, no entanto, o KBDM não demanda praticamente nenhum parâmetro de entrada, enquanto o FDM, por exemplo, precisa-se otimizar o tamanho da janela para cada espectro. Isto reflete em menos suscetibilidade à interferência humana e às possibilidades de erros, o que o torna, conseqüentemente, a melhor opção pra MRS *in vivo*, especialmente em aplicações clínicas que a automatização é sempre visada.

Um dos problemas em MRS de sistemas biológicos que o método tem potencial de atuação é em espectros de tecidos com valores de tempos de relaxação transversais intrínsecos (T_2) muito curtos. Comumente recorre-se à aquisição direta dos sinais de *Free Induction Decay* (FID), devido ao fato da aquisição de ecos de spin se tornar impraticáveis. Ainda nesses casos, os sinais com T_2 comparáveis ao “tempo morto” do espectrômetro, geram espectros com anomalias de fase e intensidades relativas, introduzidas pela perda da informação nos primeiros instantes da ocorrência do FID.

Em comparação à FT, o KBDM também pode oferecer uma melhor resolução no processamento de sinais truncados ou corrompidos, uma vez que a resolução da FT é limitada pela Relação de Incerteza do Tempo-Frequência do seu formalismo. Por ser um algoritmo de ajuste, a resolução espectral não é determinada exclusivamente pela amostragem do sinal. Além disso, o truncamento do sinal, pelo formalismo de Fourier, leva a artefatos no espectro.

O presente estudo teve como principal objetivo demonstrar a viabilidade do processamento de dados de MRS de próton utilizando o KBDM, enfatizando características importantes do método: (1) a habilidade de lidar com sinais truncados; (2) a eficiência na remoção de sinais com características específicas, como o pico residual da água, por exemplo, que claramente pode comprometer a análise precisa dos dados, (3) sua possibilidade de atuação natural como filtro passa-alta, (4) introdução (ainda não feita na literatura) como um método quantitativo.

As perspectivas futuras que decorrerão dos resultados deste trabalho incluem a introdução da técnica MRS como coadjuvante à imagem funcional por ressonância magnética (fMRI, *functional Magnetic Resonance Imaging*) para o estudo da função cerebral e a complementação da informação obtida pelos algoritmos convencionais de processamento de dados de MRS.

2 PRINCÍPIOS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

A descoberta do momento angular intrínseco do núcleo, denominado também de spin nuclear, e das suas propriedades, foram alguns dos pilares para o desenvolvimento da Ressonância Magnética, uma técnica atualmente rotineira de espectroscopia e imagem para físicos, químicos, médicos e pesquisadores de todo o mundo. A existência do momento angular de spin foi prevista teoricamente por Wolfgang Pauli na tentativa de explicar a estrutura hiperfina de linhas espectrais, e comprovada experimentalmente, em 1921, por Otto Stern e Walther Gerlach para o spin eletrônico ⁵. Em estudos posteriores, comprovou-se também esta propriedade para os prótons e os nêutrons. Outra contribuição científica, também de igual notoriedade, conduzida por Rabi em 1938 ⁶, foi a da manipulação do spin com campo magnético variado, possibilitando a troca do seu estado energético.

A partir destas descobertas, foi possível observar o fenômeno físico de RM, em 1946 ⁷⁻⁸, de forma independente por Bloch e Purcell, além de compreendê-lo, através de expressões matemáticas ⁹. Estas expressões, denominadas equações de Bloch, abordavam de forma simples e clássica a evolução da magnetização num campo magnético estático, considerando os efeitos de relaxação e a aplicação de um pulso de radiofrequência (RF).

Em 1973, um estudo ¹⁰ ampliou de forma contundente as aplicações da RM, ao demonstrar a possibilidade de se fazer imagens a partir da distribuição espacial dos spins com o auxílio de um campo magnético dependente da posição. As décadas a seguir foram, então, marcadas por um vertiginoso desenvolvimento e crescimento deste sistema para diagnósticos médicos através de imagens e espectroscopias, além de sua consolidação científica.

Este capítulo, portanto, será para ajudar a compreender esta técnica, através de uma introdução a alguns conceitos físicos básicos de RM, com ênfase em alguns conceitos mais fundamentais necessários à compreensão do presente trabalho.

2.1 Propriedades Magnéticas do Núcleo Atômico

Dentro do núcleo, cada um dos núcleons (próton ou nêutron) possui um momentum angular intrínseco (conhecido também como spin) de valor $\vec{s} = s\hbar$, sendo s , no caso de prótons

e nêutrons, um número quântico de valores $\pm \frac{1}{2}$ e $\hbar = h/2\pi$, sendo h a constante de Planck. Além do spin, cada nêutron e próton tem um movimento angular que lhe confere um momentum angular orbital $\vec{l}$, com número quântico azimutal l , cuja medida é dada por um dos valores: $-l\hbar, -(l-1)\hbar, \dots, +(l-1)\hbar, +l\hbar$.

O momentum angular total de cada núcleon, $\vec{j}$, é definido como o acoplamento dos dois momenta angulares, intrínseco e orbital ¹¹, isto é $\vec{j} = \vec{s} + \vec{l}$. A soma das contribuições individuais $\vec{j}$ de todos os núcleons resulta no momentum angular do núcleo, também denominado como o “spin” do núcleo, $\vec{I}$. Considerando a componente de $\vec{I}$ segundo um eixo arbitrário, têm-se autovalores na forma $m\hbar$, com $m = -I, -(I-1), \dots, (I-1)$.

Pela descrição do modelo de camadas, há uma distribuição dos núcleons em pares de momentum angular total nulo, isto é, qualquer nível que possua um número par de núcleons de mesmo tipo não produz contribuição para o spin nuclear. Assim, $\vec{I}$ será dado, para átomos de massa atômica (A) ímpar, pelo valor de $\vec{j}$ correspondente ao nível onde se encontra o núcleon desemparelhado. Para as situações em que A e o número atômico (Z) são pares, o spin será sempre nulo. Já, para nuclídeos (espécies atômicas caracterizadas pela constituição específica de seu núcleo, ou seja, pelo Z , o número de nêutrons, e o estado de energia nuclear) de A e/ou Z ímpares, o valor de I será determinado pelo acoplamento dos momenta angulares totais individuais do nêutron e do próton desemparelhados. Ele será inteiro quando ambos são ímpares e semi-inteiros para quando apenas um dos dois é ímpar ¹¹.

Para os valores de energia envolvidos em experimentos de RM, o momento de dipolo magnético, $\vec{\mu}$, é paralelo ao momentum angular total, $\vec{J}$, conforme descreve a expressão:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{J}, \quad (1)$$

onde γ é conhecida como razão giromagnética, assumindo valores únicos para cada núcleo. Para o núcleo de Hidrogênio (^1H), por exemplo, γ é igual a 42.58 MHz/Tesla.

Como $\vec{J} = \hbar \vec{I}$, o momento magnético pode ser descrito de acordo com a seguinte equação:

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I}, \quad (2)$$

A Equação (2), associada aos conceitos anteriormente descritos da distribuição de núcleons, permite inferir que átomos que possuem valores de Z e A pares, possuem spins e

momentos magnéticos nulos e, conseqüentemente, não podem ser estudados por RM, tais como, $^{12}\text{C}_6$ e $^{16}\text{O}_8$. Os átomos mensuráveis pela técnica são aqueles, cujo Z ou A é ímpar, ocasionando em um momento magnético semi-inteiro, como, por exemplo, são os átomos $^1\text{H}_1$, $^{17}\text{O}_8$ e $^{31}\text{P}_{15}$.

A RM tem origem na interação entre um campo magnético externo e núcleos com momentos magnéticos não nulos. Este fenômeno, conhecido como efeito Zeeman, e suas propriedades e extensões, serão discutidos classicamente e quanticamente nos próximos tópicos.

2.2 Efeito Zeeman

Em uma descrição quântica, quando um núcleo é colocado na presença de um campo magnético estático, $\vec{B}_0$, a interação entre este campo e o momento magnético faz com que ocorra um desdobramento dos níveis de energia do núcleo, conhecida como interação Zeeman. A energia magnética associada a cada núcleo devido a esta interação é dada por:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \quad (3)$$

À vista disso, a quantização do momento magnético, expressa na Equação (2), repercute em valores discretos de energia, descritos, a seguir, pelo operador hamiltoniano:

$$\mathcal{H} = -\gamma \hbar I_z B_0 \quad (4)$$

Para facilitar a identificação, os operadores vetoriais serão representados em negrito.

Deste modo, os níveis de energia ou autovalores desta equação, E , de acordo com a equação de Schrödinger independente do tempo ($\mathcal{H}\psi = E\psi$), são dados por:

$$E = -\gamma \hbar m B_0 \quad (5)$$

Considerando que o campo estático B_0 aponta na direção z (direção de quantização) e que o átomo estudado é ^1H (o núcleo mais comumente observado em RM), tem-se que m , o

autovalor do operador $\mathbf{I}_z$, pode assumir apenas os valores de $\pm \frac{1}{2}$. Assim sendo, existem dois estados possíveis: um paralelo e outro antiparalelo ao campo B_0 , cujos níveis de energia estão especificados na Equação (6) e (7), e são representados na figura subsequente.

$$E_{-1/2} = +\frac{\gamma\hbar B_0}{2} \quad (6)$$

$$E_{+1/2} = -\frac{\gamma\hbar B_0}{2} \quad (7)$$

Figura 1 - A influência do campo magnético externo B_0 na diferença entre os níveis de energia Zeeman para um sistema de spin $\frac{1}{2}$ e razão giromagnética positiva.

A magnitude de energia absorvida pelo sistema de spins, em uma transição entre os estados de menor e maior energia, é, portanto, expressa por:

$$\Delta E = \gamma\hbar B_0 \quad (8)$$

Se comparar esta equação com a expressão de Planck-Einstein que descreve a quantização da energia, $E = \hbar\omega_0$, obtêm-se a frequência de Larmor (ω_0):

$$\omega_0 \equiv \gamma B_0 \quad (9)$$

Considerando que a amostra a ser observada está numa determinada temperatura T , com a derivação da distribuição de Boltzmann, podemos definir qual é o número total de núcleos, n_j , de cada estado de energia, E_j :

$$n_j = \frac{N e^{\frac{-E_j}{kT}}}{Z}, \quad Z = \sum_{E_j} e^{\frac{-E_j}{kT}}, \quad (10)$$

sendo N o número total de átomos, k , a constante de Boltzmann, e Z , o divisor de normalização da função de partição. Deste modo, para prótons sob um campo magnético estático, a relação de proporção entre o número total de spins que se encontram em menor energia ($n_{+1/2}$) - os spins paralelos ao campo e mais populosos, e os que se encontram em maior energia ($n_{-1/2}$) - os antiparalelos, é dada por:

$$\frac{n_{+1/2}}{n_{-1/2}} = e^{\frac{-E_{+1/2} + E_{-1/2}}{kT}} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} \quad (11)$$

Embora, em temperatura ambiente, o número de spins no nível de energia inferior, $n_{+1/2}$, ultrapasse o número no nível superior, $n_{-1/2}$, a razão definida pela Equação (11), é muito próxima de um, com apenas uma ligeira variação na ordem de partes por milhão (ppm). Contudo, é essa pequena diferença entre as populações a responsável pela magnetização líquida e, consequentemente, pelo sinal do RM.

Além da interação Zeeman, há outras interações que alteram os valores de ΔE , que serão discutidas no capítulo 3.

2.3 Visão Clássica da Magnetização

Já em uma visão semi-clássica, pode-se tratar o núcleo de momento magnético não nulo, $\vec{\mu}$, como se fosse um pequeno ímã. Ao ser posicionado em um campo magnético $\vec{B}_0$, o momento magnético $\vec{\mu}$ sofre um torque $\vec{N}$, que tende a alinhá-lo com o campo magnético aplicado.

Sabe-se que o torque $\vec{N}$, exercido pelo campo magnético, é análogo à variação do momentum angular do momento magnético, que pode ser expresso da seguinte forma:

$$\vec{N} = \frac{d\vec{J}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad (12)$$

Do formalismo quântico, a equação que descreve a proporção entre o momento angular e o momento magnético, equação (1), se substituída na equação (12), resulta em:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad (13)$$

Esta equação implica que o torque aplicado resulta na precessão do $\vec{\mu}$ em torno de $\vec{B}_0$, conforme ilustrado na figura 2. Este movimento é similar ao movimento realizado por um pião girando em torno do seu eixo ¹².

Figura 2 - Movimento de precessão de um momento magnético $\vec{\mu}$ em torno do campo magnético constante $\vec{B}_0$.

Se $d\phi$ é o ângulo entre $\vec{\mu}$ inicial e final, numa variação temporal dt , e θ , o ângulo entre $\vec{\mu}$ e $\vec{B}_0$, logo, observando a figura 2, implica-se que:

$$|d\vec{\mu}| = \mu \sin(\theta) |d\phi| \quad (14)$$

E, se aplicarmos módulo na equação (13), temos:

$$|d\vec{\mu}| = \gamma |\vec{\mu} \times \vec{B}_0| dt = \gamma \mu B_0 \sin(\theta) dt \quad (15)$$

A comparação entre as equações (14) e (15), dado que $|\vec{B}_0| = B_0$, nos fornece a conhecida equação de Larmor:

$$\omega \equiv \left| \frac{d\vec{\phi}}{dt} \right| = \gamma B_0 \quad (16)$$

Considerando a regra da mão direita sobre $\vec{B}_0$ para indicar o sentido positivo, e, de acordo com o movimento de precessão definido pela equação (13) e representado na Figura 2, a magnitude da velocidade angular $\frac{d\vec{\phi}}{dt}$ é definida como:

$$\frac{d\phi}{dt} = -\omega \quad (17)$$

Deve-se enfatizar que a velocidade angular $\frac{d\vec{\phi}}{dt}$ tem vetor na mesma direção ao campo $\vec{B}_0$, mas sentido oposto.

Se o campo magnético for constante no tempo e igual a $\vec{B}_0$, a solução da equação acima, será:

$$\phi = -\omega_0 t + \phi_0, \quad (18)$$

onde ϕ_0 é o ângulo inicial. A frequência de Larmor ω_L para um campo constante é dado, portanto, por:

$$\omega_L \equiv \omega_0 \equiv \gamma B_0 \quad (19)$$

Isto é, a frequência do fóton emitido ou usado para impulsionar as transições energéticas, ilustradas na figura 1, é a mesma que a frequência de precessão do momento

magnético do próton. Outro exemplo de correspondência que a mecânica quântica faz também com as medidas clássicas é a descrição do momento magnético em função do tempo em um campo magnético estático. É possível provar que o estado de superposição arbitrária dos estados de spin paralelo e antiparalelo leva a um valor esperado do operador momento magnético idêntico à sua precessão no sentido horário, como predito classicamente para um próton. A demonstração matemática pode ser conferida na literatura ¹². Isto significa que podemos trabalhar com o momento magnético clássico, como se o conjunto de k spins nucleares fosse um pequeno ímã permanente, caracterizado pela magnetização total por unidade de volume, $\vec{M}_0$:

$$\frac{d\vec{M}_0}{dt} = \frac{\sum_k \vec{\mu}_k}{V} \quad (20)$$

O valor da magnetização M_0 é determinado durante o equilíbrio entre a tendência do sistema de spins de se alinhar com o campo externo (estado de menor energia) e sua habilidade de ganhar energia a partir de contatos térmicos.

Na ausência de campo magnético externo, os momentos magnéticos ficam aleatoriamente distribuídos, resultando em uma magnetização total nula.

A partir da equação (20), a equação (13) e as suas derivadas, podem ser reescritas para o aspecto macroscópico, substituindo $\vec{\mu}$ por $\vec{M}_0$:

$$\frac{d\vec{M}_0}{dt} = \gamma \vec{M}_0 \times \vec{B}_0, \quad (21)$$

com $\vec{B}_0$ assumindo valores constantes ou oscilantes. A partir desta expressão estruturam-se as equações de evolução de um sistema de spins que, quando adicionadas dos termos de relaxação, resultam nas equações de Bloch que serão apresentadas nas próximas seções.

2.4 Sistema de Coordenadas Girantes

Para simplificar o desenvolvimento do estudo, vamos considerar um sistema de coordenadas girantes (*CG*), isto é, uma base (x' , y' e z') em que os eixos x' e y' giram com uma velocidade angular $\vec{\Omega}$ e o eixo $z' = z$, como está representada na figura 3(a). Iremos supor que não há diferença entre a velocidade angular do sistema e a da magnetização da amostra, ou seja, $\vec{\Omega} = \vec{\omega}_0$. A figura 3(b) compara a precessão da magnetização em um sistema de coordenadas do laboratório (*CL*) com o sistema que definimos *CG*, representado na figura 3(c). A magnetização no sistema *CL* encontra-se precessionando, enquanto, no girante, ela se apresenta estática.

Figura 3 - (a) Diagrama comparativo entre o Sistema de Coordenadas Girante $x' y' z'$, de velocidade angular $\vec{\Omega}$, com a do Laboratório ($x y z$). (b) e (c) Representam a magnetização total sob um campo magnético estático B_0 num sistema *CG* e *CL*, respectivamente.

Quando Ω é diferente da condição de ressonância, a equação (21) precisa ser reescrita para:

$$\left(\frac{d\vec{M}_0}{dt}\right)_{CG} = \gamma(\vec{M}_0 \times \vec{B}_{ef}), \quad (22)$$

com o campo efetivo $B_{ef} = B_0 + \frac{\Omega}{\gamma}$ e Ω , a magnitude da velocidade vetorial angular, ou, em outras palavras, a frequência angular.

Da expressão (22) nota-se que a magnetização, quando em *CG*, precessiona em torno de um campo efetivo B_{ef} e não mais de B_0 . Este fato terá particular importância para a

compreensão minuciosa do sistema de recepção, o qual não será feito aqui, mas pode ser explorado na literatura ¹². Para a nossa fundamentação teórica, consideraremos a condição de ressonância, ou seja, $\Omega = \omega_0$.

2.5 Aplicação pulso RF

Suponhamos que posicionemos uma amostra em um campo magnético estático de intensidade B_0 e na direção z .

$$\vec{B}_{ext}(t) = \vec{B}_0 = B_0 \hat{z}, \quad (23)$$

Para obter um espectro deste sistema, o espectrômetro precisa ter, além de um magneto, fonte do campo estacionário $\vec{B}_0$, bobinas para excitação e detecção no plano xy , que geram e detectam magnetização no plano transversal. O campo mais eficiente para fazer esta excitação tem que ter uma oscilação harmônica, sendo ω a sua frequência angular nas CL, tal qual a frequência de precessão do sistema de spins, isto é, ele se será constante no sistema CG – condição de ressonância: $\omega = \omega_0$. Como foi visto na equação (17), a precessão se passa no sentido negativo (horário) nas CL em relação a B_0 , portanto, o pulso de excitação precisa ser circularmente polarizado para a esquerda, que denominaremos $\vec{B}_1$. Sua expressão matemática, representada nas coordenadas CL, é dada a seguir:

$$\vec{B}_1 = B_1(\cos(\omega t) \hat{x} - \sin(\omega t) \hat{y}) = B_1 x' \quad (24)$$

A frequência ω do campo $\vec{B}_1$, para os casos de espectroscopia por Ressonância Magnética (MRS, *Magnetic Resonance Spectroscopy*) de próton em um campo B_0 de algumas unidades de tesla, situa-se na faixa da radiofrequência, uma vez que esta é a faixa de frequências de precessão dos prótons.

Assim, o campo magnético externo durante a aplicação do pulso, será formado pela superposição dos dois campos:

$$\vec{B}_{ext}(t) = B_0 \hat{z} + B_1 \hat{x}' \quad (25)$$

Desenvolvendo a equação (21) podemos obter uma expressão similar à equação (22), em que $\vec{B}_{ef} = \vec{B}_{ext}$. Como no CG é apenas a componente $\vec{B}_1$ que efetivamente leva uma variação temporal da magnetização, teremos:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma (\vec{M} \times \vec{B}_1), \quad (26)$$

Isto implica que a magnetização sofrerá uma inclinação θ em relação à z , na base CG e, no referencial CL , a ponta do vetor que a representa percorrerá uma trajetória espiralada ao longo de uma superfície esférica, representada na figura 4.

Figura 4 - Evolução da magnetização total sob um campo magnético estático após aplicação de pulsos de RF com diferentes durações. Comparam-se dois sistemas de coordenadas: CL (à esquerda) e CG (à direita), cuja frequência de rotação é igual à frequência de ressonância. Os pulsos de RF são: (a) 45° (b) 90° e (c) 180° .

A figura 4 ilustra o movimento de rotação da magnetização quando sujeito a um pulso curto, cujo ângulo θ percorrido por $(\vec{M}_0)_{CG}$ é dado em função do tempo total de aplicação do pulso (T), como explicitado abaixo:

$$\theta = \gamma \int_0^T B_1(t) dt, \quad (27)$$

θ é conhecido como ângulo de *Flip* e alguns exemplos de valores bastante utilizados para as sequências dos experimentos de RM são ângulos de 90° e 180° . A sequência que foi empregada nesta pesquisa, PRESS (*Point RESolved Spectroscopy*), por exemplo, é definida por um encadeamento de um pulso de 90° , um de 180° e outro de 180° .

2.6 Processos de Relaxação e Equações de Bloch

A equação (21) não contempla as interações entre os prótons, e, em um sistema real, a flutuação do campo magnético local experimentada por cada momento magnético nuclear devido ao campo gerado pelos vizinhos, associada à agitação térmica dos dipolos, também influencia o comportamento da magnetização total do sistema. Através destes processos mencionados é que, após uma perturbação, a magnetização retorna ao equilíbrio térmico. Este fenômeno é denominado relaxação.

A primeira forma de interação entre os spins citada acima é conhecida como relaxação ‘spin-spin’ ou relaxação transversal, por resultar no decaimento da magnetização transversal. Depois de aplicado um pulso RF, a relação entre os dipolos acarreta em pequenas diferenças nas frequências de precessão dos mesmos, ou seja, há perda de coerência de fase entre os momentos magnéticos, vide figura 5. Como a magnetização transversal é a soma vetorial de todas as componentes transversais individuais, este efeito de defasagem coletiva implicará em uma redução exponencial da magnetização transversal ao longo do tempo, com um tempo característico representado por T_2 , como está demonstrado na figura 6. O valor de T_2 tende a aumentar com a intensificação do movimento nuclear translacional, por exemplo, podendo ser na faixa de microssegundos, em sólidos, ou segundos, bastante comum em líquidos¹³.

Na prática, existe, também, uma defasagem a mais introduzida pelo fato do campo estático não ser idealmente homogêneo. Embora os espectrômetros, frequentemente, permitam fazer o *shimming* do sistema (termo utilizado para o processo de homogeneização do campo magnético), a inomogeneidade remanescente é suficiente para acelerar a relaxação transversal. Com isto, é necessário definir uma constante de tempo da relaxação transversal total, T_2^* . Há formas de recuperar esta perda de magnetização extra, aplicando, por exemplo, um pulso de 180° , que inverterá a defasagem oriunda de uma distribuição estática de

frequências de precessão, levando a observar um fenômeno conhecido como “eco spin”, explicado com mais detalhe na seção 2.8.

Figura 5 - Diagrama da relaxação transversal. Representação do comportamento de um sistema de spins nucleares μ_i , e a magnetização longitudinal (ML) e a magnetização transversal (MT), sob um campo magnético estático B_0 , no decorrer de uma sequência de eventos: (a) Inicialmente: ML máxima e MT nula. (b) Aplicação de um pulso de 90° (ML nula e MT máxima). (c) Após certo tempo, as isocromatas já apresentam alguma dispersão entre si (referencial CG), acarretando na diminuição da MT. (d) Após um período maior, o sistema ainda não retornou ao equilíbrio (ML < M_0), mas o sistema já relaxou completamente no plano transversal, portanto $T_2 < T_1$.

Além da relaxação transversal, há também a longitudinal, ou, relaxação ‘spin-rede’. Ela está relacionada com o retorno da magnetização ao seu estado de equilíbrio, isto é, a magnetização longitudinal (M_L) ao longo do eixo z ($M_L = M_0$) e a magnetização transversal à zero ($M_T = 0$). Este processo pode ser descrito pela evolução das isocromatas de spin (grupo de spins sob um campo local cuja variação é pequena que possa ser considerada constante) após a aplicação de um pulso de 90° , como está demonstrado na figura 5. Este aumento ocorre exponencialmente ao longo do tempo e é caracterizado pela constante de tempo T_1 , como está esquematizado na figura 6. T_1 pode assumir desde milissegundos em líquidos até meses em sólidos. Já em tecidos biológicos, a faixa do T_1 para o ^1H , é tipicamente 0,05 a 3 segundos¹³. Se compararmos os dois tempos de relaxação, observaremos que T_2 é sempre menor ou igual a T_1 , exemplificado na figura 5(d), visto que as isocromatas podem perder a coerência antes de todos os spins nucleares realinharem com $\vec{B}_0$. e, conseqüentemente, a magnetização

transversal terá relaxado completamente, antes da longitudinal ter voltado ao seu valor inicial. Isto ocorre porque há mais mecanismos contribuindo para a relaxação transversal do que para a longitudinal.

Figura 6 - Evolução da Magnetização transversal (M_T), linha azul, e longitudinal (M_L), linha vermelha, após a aplicação de um pulso de excitação.

A constante de tempo T_1 corresponde ao tempo necessário para restabelecer 63% da distribuição da população de spins entre os níveis de energia nucleares do equilíbrio térmico (63% da magnetização longitudinal). Já T_2 está relacionado à evolução, ocasionada pela flutuação dos campos locais¹³, da magnetização transversal. Ele é igual o tempo transcorrido até atingir 37% do valor inicial da magnetização.

Juntas, as duas formas de relaxar fazem com que a magnetização $\vec{M}$ retorne ao seu estado de equilíbrio. Combinando as duas componentes da relaxação com a equação (21), obtêm-se uma única equação vetorial empírica, designada por Equação de Bloch:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M}(t) \times \vec{B}_{ext}(t) - \frac{\vec{M}_t(t)}{T_2} + \frac{(M_0 - M_z(t))\hat{z}}{T_1}, \quad (28)$$

Esta equação pode ser solucionada supondo qualquer campo magnético total externo, tal como, $\vec{B}_{ext} = B_0\hat{z}$ (igual a um campo estático), ou, com a aplicação do pulso $B_1\hat{x}'$,

resultando em $\vec{B}_{ext} = B_0 \hat{z} + B_1 \hat{x}'$, ou, ainda, após a sua aplicação. Neste último caso, para pulso de curta duração, a solução seria dada por:

$$M_{x'}(t) = e^{-\frac{t}{T_2}} M_{x'}(0) \quad (29)$$

$$M_{y'}(t) = e^{-\frac{t}{T_2}} M_{y'}(0) \quad (30)$$

$$M_z(t) = M_z(0) e^{-\frac{t}{T_1}} + M_z(0) \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right) \quad (31)$$

Os pulsos RF na maioria dos experimentos em RM são projetados para durações curtas¹².

2.7 Do Sinal de RM ao Espectro

Se um sistema com a magnetização M_z em equilíbrio é excitado por um pulso de RF de curta duração de 90° , uma magnetização transversal é criada (plano xy). Finalizado a duração do pulso, a magnetização começa a relaxar e durante esse período é captado um sinal característico, conhecido por *Free Induction Decay*.

O sinal gerado, em resposta a variação do fluxo magnético, é explicado pela indução eletromagnética descrita pela lei de Faraday, e sua expressão matemática, em termos de magnetização ($\vec{M}$) e eficiência da bobina receptora ($\vec{\beta}_{rec} = \vec{B}_{rec}/I_{rec}$), pode ser obtida através do princípio da reciprocidade¹⁴⁻¹⁵, que estabelece:

$$\varepsilon = - \frac{d \left(\iiint_V \vec{\beta}_{rec} \cdot \vec{M} d^3r \right)}{dt}, \quad (32)$$

sendo ε a força eletromotriz induzida na bobina receptora, gerada pela variação de fluxo, e V , o volume da amostra. No retorno à condição de equilíbrio, portanto, a magnetização precessiona de forma espiralada ao longo do eixo z (como já foi discutido - vide figura 4) e

induz, consequentemente, uma tensão elétrica na bobina de recepção, cujo eixo central se encontra no plano transversal.

Se trabalhar a equação (32) com as soluções de Bloch, as equações (29), (30) e (31), se verificará que o sinal de RM pode ser definido como proporcional à magnetização transversal $\vec{M}_T$:

$$\text{sinal} \propto \iiint_V \omega(\vec{r}) \beta_T(\vec{r}) M_T(\vec{r}, 0) e^{\frac{-t}{T_2}} e^{-i\omega(\vec{r})t} d^3\vec{r} \quad (33)$$

com β_T sendo o campo magnético por unidade de corrente na bobina receptora no plano transversal, e $\omega(\vec{r})$ a consideração de possíveis variações que o campo magnético pode apresentar na componente z do campo magnético local.

A substituição de T_2 por T_2^* deve ser feita quando houver a presença de inhomogeneidade no campo externo. É importante ressaltar que, devido à relaxação T_2 , a magnetização transversal e, consequentemente, também o FID, geralmente decaem exponencialmente em função do tempo para MRS *in vivo*.

Quando há necessidade de localização espacial, por exemplo, para a geração de imagens 2D ou 3D, e para a espectroscopia *in vivo*, a frequência de precessão dos spins do sistema precisa apresentar pequenas diferenças em função do espaço. Estas diferenças estão relacionadas com a aplicação proposital de uma variação espacial local do campo magnético, de forma conhecida, na forma de um gradiente da componente z do campo magnético, e pode ser feita acrescentando variações em B_0 nas direções x, y e z. Estas alterações no campo magnético implicam em um acréscimo (ou decréscimo) na frequência de precessão em função do espaço, $\Delta\omega(\vec{r})$, como descrito abaixo.

$$\omega(\vec{r}) = \omega_0 + \Delta\omega(\vec{r}) \quad (34)$$

Além disso, a localização espacial envolve, também, conhecer as fases acumuladas dos spins do sistema até a aquisição, que pode ser calculada a partir das frequências finais, ao multiplicar cada frequência pelo tempo de evolução: $\omega(\vec{r})t$.

Outra etapa importante na formação de imagens e espectros é a aquisição. Para isto, é indispensável que as componentes x e y do sinal sejam detectadas separadamente (detecção por quadratura) pelos espectrômetros de RM. A fase em que se encontra cada um dos sistemas

de spins, principalmente a relação entre eles, é um dado importante e consegue apenas ser determinado a partir das duas componentes do sinal (x , y). A aquisição de apenas uma das componentes poderia gerar ambiguidade nos resultados (sinais cujos módulos das fases fossem iguais teriam a mesma representação).

Após a aquisição, o sinal é, então, demodulado e filtrado. A demodulação envolve a multiplicação do sinal por uma cossenóide e, paralelamente e de forma independente, por uma senóide, ambas de frequência $\omega_{ref} \cong \omega_0$. Cada um destes sinais resultantes é “guardado” em um “canal”: canal Real (em fase com uma referência arbitrária) e canal Imaginário (em quadratura de fase com a mesma referência), respectivamente. Cada sinal demodulado, possui duas componentes: uma de frequência alta (aproximadamente $2\omega_0$) e outra de frequência baixa ($\delta\omega = \omega_{ref} - \omega_0$). Então, passa-se um filtro passa-baixa para manter apenas a componente com faixa de frequência próxima de zero. Para facilitar os cálculos, as formas do sinal do canal real e imaginário são representadas de forma complexa.

Do FID, podemos enfocar quatro parâmetros principais:

- Amplitude (A): proporcional à concentração do núcleo estudado na amostra;
- Frequência de oscilação ($\Delta\omega$): diferença entre a frequência de ressonância do sinal ω e a frequência ajustável de referência ω' do detector de fase;
- Tempo de relaxação (T_2^*): depende do tempo de relaxação intrínseco T_2 e da homogeneidade do campo magnético estático, refletindo na largura do pico;
- Fase inicial (ϕ_0): está relacionada com a posição do vector M no início da aquisição FID e é representado como deslocamento do FID (seno ou cosseno) ao longo do eixo do tempo. Por exemplo, para a fase $\phi_0 = 90$, a amplitude do FID, descrito apenas pela parte imaginária, é igual à amplitude da parte real, em $\phi_0 = 0$.

Embora os FIDs já contenham toda a informação relevante sobre os spins nucleares, como suas frequências de ressonância e sua abundância relativa, eles são raramente utilizados diretamente, devido à dificuldade de manipulação e de análise pelo usuário. Normalmente, os dados que se encontram no domínio do tempo são convertidos para o domínio da frequência, resultando no espectro. O método mais amplamente utilizado para esta conversão é a Transformada de Fourier¹⁶. Uma discussão sobre este formalismo será desenvolvida na seção 3.4.2. Para exemplificar as diferenças do sinal no domínio no tempo e na frequência vide figura 7, com a figura 7(a) ilustrando uma combinação de FIDs e a figura 7(b), seu correspondente espectro depois de aplicado a FT. Da figura, é importante observar a

facilidade de extração de informações relevantes do espectro em comparação ao FID, tais como amplitude, frequência, e largura a meia altura.

Visto que computadores só trabalham no domínio digital, o sinal adquirido, antes de ser submetido ao formalismo da FT, precisa ser convertido em uma série de números discretos e equidistantes no tempo (amostragem), realizado pelo conversor analógico-digital (ADC). Uma vez amostrado o sinal, ele é submetido a um algoritmo baseado na Transformada de Fourier Discreta (DFT, *Discrete Fourier Transform*).

Figura 7 – Simulação de FIDs diferentes e o respectivo espectro do FID resultante. Dados da simulação: FID/Pico 1: Amplitude (A) = 1 u.a., frequência(f) = 384 Hz, $T_2 = t = 0,011$ s; FID/Pico 2: A : 2 u.a., f = 256 Hz, $T_2 = 3t$ e FID/Pico 3: A = 2,85 u.a., f = 128 Hz, $T_2 = 6t$. Todos os picos possuem fase inicial nula. (a) FID de três sistemas de spins distintos. Apresentados de forma individual (três primeiros gráficos) e o último, composto pela mistura dos três. (b) FT do último FID (composição de 3 sistemas diferentes de spins).

2.8 Eco de Spins

Praticamente todas as definições matemáticas, até o momento, exigem um campo magnético externo uniforme embora os magnetos reais não produzam campos perfeitamente homogêneos. Como já foi mencionado na seção 2.6, a inomogeneidade do campo estático aumenta o tempo total de relaxação transversal do sistema de spins. A vista disto, o tempo de relaxação efetivo, T_2^* , se torna uma combinação de T_2 e T_2' . A constante T_2 está relacionada à relaxação produzida por flutuações do campo interno, e, conseqüentemente, é considerada um processo irreversível termodinamicamente. Já T_2' , é um processo reversível, pelo menos a princípio, uma vez que ele resulta da evolução da fase dos spins devido a condições bem definidas, embora desconhecidas, dadas em função da intensidade do campo externo, que sofre variações espaciais, mas independente do tempo (portanto, condições estáticas). Este aspecto possibilitou o surgimento de sequências de pulsos para a recuperação do valor intrínseco de T_2 , através da observação do fenômeno eco de spin.

Uma forma de observar o eco de spins é após aplicação de dois pulsos: um pulso de 90° , para excitação, seguida por um de 180° , após um tempo τ , para a refocalização dos spins, conforme a figura 8. Após o primeiro pulso, a magnetização no plano transversal, começa a relaxar, com o início da recuperação da magnetização longitudinal e, concomitantemente, a diminuição da coerência transversal, caracterizada por T_2^* . Este processo foi representado anteriormente na figura 5 (a)(b)(c).

Posteriormente ao segundo pulso, a magnetização transversal começa a recuperar apenas a coerência perdida devido à inomogeneidade estática do campo externo, atingindo seu máximo valor no tempo de 2τ , Tempo ao Eco (TE). Após alcançar seu ápice, a magnetização transversal inicia o processo de redução novamente. Este sinal extra que marca a recuperação da magnetização transversal após ela ter aparentemente acabado, figura 8, foi denominado eco de spin por Hanh¹⁷, primeiro cientista a observá-la em 1950. Vale enfatizar que esta máxima coerência atingida não recupera o valor de magnetização inicial, produzida pela excitação, pois a perda de coerência sofrida pelo sistema através das interações dipolares é irreversível. O que ela obtém é o valor máximo possível para a magnetização transversal total naquele instante. Por este motivo, em muitos experimentos de RM, a aquisição do sinal durante o eco é o mais empregado.

Figura 8 – Representação gráfica da evolução do FID e formação do eco (figura inferior) a partir da aplicação de um pulso RF de 90° e 180°, separados temporalmente por τ (figura superior). O gráfico do FID está descrevendo a relaxação transversal com T_2 (em CG, linha pontilhada, e T_2^* (em CG, linha azul, e CL, linha vermelha).

3 ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

A espectroscopia pode ser definida, de forma geral, como o estudo da interação entre a matéria e a radiação. A maioria das técnicas atualmente empregadas utilizam como radiação as ondas eletromagnéticas. A interação, nestes casos, é caracterizada pela absorção, emissão e espalhamento de fótons, de modo que as energias dos fótons correspondam exatamente a uma diferença de nível de energia do elemento a ser caracterizado. Átomos e moléculas tem uma gama de níveis de energia discretos correspondentes a diferentes estados vibracionais, rotacionais e eletrônicos. A interpretação dos espectros, em um nível prático, fornece uma base para a determinação da composição química qualitativa, da estrutura química e para análises químicas quantitativas.

Uma vez que a energia de um fóton é proporcional à frequência, as diferentes formas de espectroscopia são geralmente distinguidas com base nas frequências envolvidas. Por exemplo, modos vibracionais moleculares são caracterizados por meio de frequências abaixo da luz vermelha visível e, assim, são estudados com a espectroscopia de infravermelho. As energias envolvidas na redistribuição de elétrons em moléculas e nas transições eletrônicas em cristais e semicondutores requerem frequências no ultravioleta ou no visível, dando origem a espectroscopia eletrônica. Já a MRS, técnica de interesse deste trabalho, utiliza as radiofrequências, que são tipicamente na gama de 10-800 MHz, para estudar das propriedades magnéticas (e energias) de núcleos.

A diferença do nível de energia induzida pela MRS nos spins nucleares sob um campo magnético externo é muito pequena, quando comparada com a energia térmica, levando todos os níveis de energia, pertencentes à estrutura fina, estarem quase igualmente preenchidos (mais detalhes vide tópico 2.2). Como o sinal resultante da absorção de fótons é muito fraco, a MRS é bastante insensível quando comparada com as outras formas de espectroscopia. No entanto, a baixa absorção de energia torna MRS, além de uma técnica não invasiva, uma técnica não destrutiva, ideal para medidas *in vivo*.

Bloch foi o primeiro a utilizar RM num sistema vivo, por meio da observação do sinal da água do seu próprio dedo. Pouco depois da descoberta de RM, outros demonstraram a utilidade da aplicação de MRS para estudar estruturas vivas. No início de 1970, foram feitos os primeiros experimentos de MRS em tecidos vivos intactos. Um dos estudos deste período foi o de Moon e Richards ¹⁸, que utilizando MRS de ³¹P em glóbulos vermelhos intactos, mostraram como o pH intracelular pode ser determinado a partir de diferenças de

deslocamento químico, ou, *chemical shift* (denominação mais utilizada, mesmo na literatura brasileira).

As metodologias de MRS para aplicações *in vivo* evoluíram a partir de sequências de pulsos de RF relativamente simples, compostas inicialmente de um ou dois pulsos, para técnicas complexas que envolvem localização espacial, supressão de lipídios, de água e de volume externo. Ademais, a edição espectral se estabeleceu como uma etapa de grande importância durante os procedimentos de RM, pois foi através da introdução de técnicas de pós-processamento e aperfeiçoamento da análise espectral que se tornou possível extrair, de forma eficiente e confiável, parâmetros físicos e químicos do espectro.

Neste capítulo, serão tratados alguns princípios físicos básicos de espectroscopia por ressonância magnética, a aplicação de MRS de próton *in vivo*, com especial atenção ao campo de neurologia, as metodologias e processamentos dos dados adquiridos e algumas dificuldades encontradas neste campo.

3.1 Chemical Shift

Na maioria dos experimentos em RM, a finalidade é observar apenas um tipo de espécie atômica da amostra. E, de acordo com a equação (9), núcleos de mesmo elemento (ou isótopo), mesmo em diferentes moléculas, ressoam com a mesma frequência, sob um campo magnético externo constante e homogêneo, uma vez que os valores de razão giromagnética (γ) são idênticos. Se a frequência do spin nuclear fosse unicamente determinada pelo campo B_0 , como sugere a equação (9), a MRS não teria a importância que se tem atualmente para a química e medicina.

A frequência de ressonância ω_0 não depende apenas da constante giromagnética e do campo magnético externo B_0 , mas também é altamente sensível ao campo magnético local determinado pelo ambiente químico em que se encontram os núcleos sob investigação. A nuvem eletrônica que se distribui ao redor do núcleo também tem carga, movimento e, desta maneira, um momento magnético. O campo B_0 aplicado interage com o momentum angular orbital eletrônico, dando origem a um pequeno campo magnético adicional, que se sobrepõe ao campo externo no microambiente em que se encontra o núcleo¹⁹. Esta modulação de B_0 pelos elétrons é denominada blindagem, ou anisotropia diamagnética, e é representada

quantitativamente por σ . A constante de blindagem σ é calculada em função da geometria e densidade da nuvem eletrônica.

A densidade eletrônica e sua distribuição temporal e espacial podem variar de um núcleo para outro de mesmo elemento químico, vide figura 9. Aliás, eles ainda podem fazer parte da mesma molécula, conectados através de ligações que podem ser diferentes. Ao serem colocados num campo magnético estático B_0 , os elétrons giram num sentido oposto ao da precessão dos prótons, em torno deste campo.

Figura 9 – Influência da densidade eletrônica na blindagem do núcleo de hidrogênio em ambientes químicos distintos: (a) Maior presença eletrônica e, conseqüentemente, maior blindagem (B_{sh}) e menor campo efetivo (B_{eff}) sobre o núcleo. (b) Devido a uma maior eletronegatividade do oxigênio, há uma menor blindagem eletrônica sobre o 1H e conseqüentemente B_{eff} é maior e B_{sh} , menor.

A precessão de elétrons, por envolver um movimento de carga, induz um campo magnético (B_{sh}), cuja intensidade é proporcional ao campo externo B_0 , embora seu sentido se oponha. Portanto, o campo magnético efetivo sentido pelo núcleo ($\vec{B}_{eff}$), pode ser expresso de acordo com as equações (35) e (36), respectivamente.

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_0 - \sigma \vec{B}_0 = (1 - \sigma) \vec{B}_0 \quad (35)$$

Pela equação de Bloch, expressa na equação (9), podemos determinar a correspondente frequência de ressonância em Hertz (ν) do $\vec{B}_{eff}$:

$$\begin{aligned}\omega &= \gamma(1 - \sigma)\vec{B}_0 \\ \nu &= \frac{\gamma(1 - \sigma)\vec{B}_0}{2\pi}\end{aligned}\quad (36)$$

As variações que pode assumir a frequência de ressonância de um mesmo elemento químico conforme seu ambiente químico foram denominados *chemical shifts*

É importante ressaltar que as diferenças entre as frequências de ressonância em diferentes ambientes químicos são muito pequenas. Por exemplo, para um campo magnético de 1,4 T, apesar do pulso de RF ter frequência de aproximadamente 60 MHz, a diferença entre a frequência de ressonância do clorometano e do fluorometano é de 72 Hz, ou seja, apenas algumas partes por milhão (ppm)²⁰.

Há também variação nos valores das frequências de ressonância conforme a intensidade do campo magnético externo. Nesse sentido, para possibilitar comparar espectros de diferentes espectrômetros, um composto de referência é colocado na solução da substância a ser medida, e sua frequência de ressonância é utilizada como o zero da escala. A substância referência padrão usada para MRS de ¹H é o tetrametilsilano, (CH₃)₄Si, também referenciado como TMS. Este composto apresenta os prótons dos grupos metil mais bem blindados do que os da maioria dos outros compostos conhecidos²⁰. No entanto, a utilização de TMS é restrita a RM de compostos em solventes orgânicos. Para as soluções aquosas, é normalmente utilizado o ácido 3-(Trimetilsilil)propiónico (TSP) ou 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfônico (DSS), dos quais o DSS é mais aplicado, já que seu *chemical shift* é independente da temperatura e do pH²¹. Infelizmente, nenhum destes compostos é encontrado em sistemas *in vivo* e não podem, portanto, ser utilizados como referências internas, como será exposto no tópico 3.3.

Assim, o *chemical shift* (δ) de um núcleo pode ser definido como a diferença entre a sua frequência de ressonância ν em relação a uma referência ν_{ref} . Para eliminar a dependência do campo magnético, divide-se esta diferença (em Hz) pela ν_{ref} (em MHz), conforme expressão abaixo:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad (ppm) \quad (37)$$

O conjunto de *chemical shifts* de um composto químico, cuja estrutura contenha pelo menos um átomo cujo spin nuclear está sob investigação, possua uma impressão digital única, possibilitando o estudo e a identificação das estruturas moleculares. A figura 10 exemplifica um espectro de RM de próton do lactato, um metabólito encontrado tanto no cérebro quanto em outras partes do corpo. Ele é caracterizado por um dubleto em 1,31 ppm, e um quarteto em 4,09 ppm, que geralmente não é observado *in vivo*, devido a sua proximidade ao pico da água (linha centrada, a 37°C, em 4,7 ppm, cuja área está na ordem de 10 000 vezes maior que a área dos picos dos metabólitos).

Figura 10 – Espectro de RM de próton do lactato simulado pelo NMR Scope do jMRUI 5.0²² como MRS de próton. Está representada apenas a magnitude absoluta. Dados: TE = 36ms, campo 3T, banda de 2KHz.

É importante relatar que o *chemical shift* do núcleo a ser observado é proporcional a eletronegatividade do elemento em que ele se encontra ligado²⁰.

Há outras particularidades a serem avaliadas nos espectros, além dos *chemical shifts*, como, por exemplo, interações de natureza magnética que resultam em acoplamentos de momentos magnéticos (entres spins nucleares ou spins nucleares e eletrônicos). Acoplamentos introduzem, geralmente, um conjunto de mudanças nas frequências de Larmor que são identificáveis no espectro como desdobramentos das linhas. Dentre os acoplamentos, o exemplo mais comum é o acoplamento J que será discutido a seguir.

3.2 Acoplamento escalar

Outro aspecto que pode ser observado em espectros de RM de alta resolução é a divisão dos picos de ressonância em várias linhas de menor intensidade. Tal fenômeno ocorre devido ao acoplamento entre spins. Os núcleos que possuem momentos magnéticos podem influenciar uns aos outros, tanto diretamente (acoplamento dipolar ou dipolo-dipolo), quanto por meio de elétrons em ligações químicas (denominado acoplamento escalar, J ou spin-spin indireto) ²¹. Em líquidos, as interações dipolares não são as responsáveis pela estrutura fina dos espectros, já que as moléculas têm movimentos rápidos e aleatórios, resultando em uma influência média nula, embora o acoplamento direto seja o mecanismo predominante na relaxação ¹⁹. Já nos espectros de amostras sólidas, a interação dipolar assume importante contribuição.

Para analisar os espectros *in vivo*, o acoplamento spin-spin deve ser mais bem compreendido. O fenômeno pode ser explicado pela polarização dos elétrons ao redor de um determinado núcleo de spin não nulo que se conecta a outros também de spins não nulos por ligações químicas. Esses elétrons polarizados influenciam outros elétrons através da ligação, resultando na polarização dos demais núcleos. A força da interação é expressa em termos da constante de acoplamento escalar J , medida em hertz (Hz). Como a magnitude das interações depende somente das propriedades nucleares, J é independente do campo externo.

Considere dois átomos X e Y, de spin nuclear $\frac{1}{2}$. Os elétrons dos orbitais s têm uma probabilidade finita de estar sobre o núcleo, o que origina uma interação hiperfina entre o spin nuclear e o eletrônico. O contato de Fermi governa esta interação e favorece (energeticamente) um arranjo antiparalelo entre eles, em detrimento a um paralelo, conforme representado na figura 11(a). Em termos de diagrama de nível de energia, os dois níveis de energia de X e os dois de Y podem ser combinados como está esquematizado na figura 12(a). O diagrama possui quatro níveis de energia, correspondente a quatro combinações distintas dos spins nucleares, e a quatro transições nucleares. As transições podem ser separadas em dois grupos energéticos diferentes que darão origem a duas frequências de ressonância ν_X e ν_Y .

Suponha, agora, que X e Y estejam unidos por uma ligação covalente, como na figura 11(b). A interação entre os dois elétrons da ligação será, então, regida pelo princípio da exclusão de Pauli, o que implica que os spins eletrônicos tem que ser antiparalelos. Para

facilitar a explicação, denominaremos o estado energético α quando o spin nuclear for paralelo ao campo e, em β , antiparalelo. Portanto, se ambos os spins nucleares forem antiparalelos ao campo magnético externo B_0 , isto é, estado de alta energia $\beta\beta$, os dois elétrons da ligação não podem ser ambos antiparalelos aos spins nucleares, devido à exclusão de Pauli, resultando em um estado energeticamente menos favorável, vide figura 12(b). O estado $\beta\beta$ aumentará o nível energético por uma quantidade proporcional a $^1J_{XY}/4$, onde J_{XY} é a constante de acoplamento escalar entre X e Y em uma ligação simples. Assim, podem-se explicar também os demais estados, outro menos favorável energeticamente, $\alpha\alpha$, e os mais favoráveis, com redução energética, $\alpha\beta$ e $\beta\alpha$, como estabelece a figura 12(b). Estas pequenas diferenças implicam em um diagrama energético diferente, em que as quatro transições possíveis, corresponderão a quatro frequências de ressonância diferentes: para o átomo X, $(\nu_X + ^1J_{XY}/2)$ e $(\nu_X - ^1J_{XY}/2)$ e, para o átomo Y, $(\nu_Y + ^1J_{XY}/2)$ e $(\nu_Y - ^1J_{XY}/2)$.

Figura 11 – Interação spin-spin entre os átomos X e Y. (a) Átomos isolados, em que o Contato de Fermi favorece energeticamente a orientação antiparalela entre o spin nuclear e o eletrônico em ambos os átomos. (b) Ligação covalente entre X e Y, com acoplamento escalar.

O Princípio de exclusão de Pauli demanda que as orientações dos spins eletrônicos presentes na ligação sejam antiparalelas entre si, e dependendo do spin do núcleo, as orientações entre ele e o spin eletrônico assumem uma orientação paralela e energeticamente mais alta – caso do átomo X.

Figura 12 - Níveis de energia de um sistema XY. Os quatro níveis sem acoplamento (à esquerda) e com acoplamento spin-spin positivo (à direita). (a) As transições energéticas $\alpha \rightarrow \beta$ de X ou Y, em um sistema com acoplamento, podem ser mais favoráveis energeticamente ou menos, levando a quatro ressonâncias distintas. (b) Em um sistema sem acoplamento, há apenas duas intensidades diferentes de ressonância, uma correspondente a X e outra a Y.

É importante notar que as duas frequências são separadas apenas pela constante de acoplamento, e que esta é independente do campo magnético, como ilustra a figura 13.

Figura 13 – Inicialmente estão representados os espectros de dois átomos, X e Y, não acoplados. Logo abaixo está a representação do espectro quando ocorre o acoplamento escalar entre X e Y. Há uma divisão dos singletos das ressonâncias destes átomos em dubletos, que são separados pela constante J. As ressonâncias, nas frequências mais baixas e mais altas para os dois átomos, são associadas com transições energéticas, em que o spin nuclear do átomo que se acopla, pode assumir o estado de spin α ou β . Um exemplo de átomos acoplados X e Y é o acoplamento escalar do ^{13}C com o ^1H .

A maioria dos metabólitos cerebrais apresentam estruturas finas regidas por constantes de acoplamento já desvendadas ²³. No lactato, por exemplo, se não houvesse acoplamento, cada próton do grupo $^3\text{CH}_3$ geraria um singlete a 1.31 ppm do espectro. Entretanto, a presença do acoplamento entre o próton e o carbono ($J_{\text{CH}}=6,93$ Hz) faz com que o suposto singlete seja um dubleto, pelo mecanismo já explicado acima. Portanto o que se observa é um dubleto em 1,31 ppm, com os picos separados de 6,93 Hz, e área correspondente a três dubletos idênticos sobrepostos, vide figura 10.

Argumentos semelhantes podem ser usados para explicar acoplamentos escalares separados por até duas ou três ligações químicas na mesma molécula, ou, também, entre mais de dois spins nucleares. Para o primeiro caso deve se atentar para os valores de J , que diminui rapidamente com o aumento do número de ligações químicas entre os átomos acoplados e tipicamente pode ser ignorada por quatro ou mais ligações ²¹. Supondo ser n o número de ligações químicas entre dois átomos acoplados, e nJ sua correspondente constante de acoplamento, para o ^{13}C e o ^1H , um valor característico de $^1J_{\text{CH}}$ seria entre 120 e 250 Hz, e $^2J_{\text{CH}}$ entre -10 a +20 Hz, como em $^{13}\text{C}-\text{C}-\text{H}$ ¹⁹.

Um ponto sutil a ser observado quando há acoplamento entre dois ou mais spins nucleares é a relação entre as intensidades das linhas pertencentes à estrutura fina. Em geral, n spins $1/2$ nucleares equivalentes dividem a(s) linha(s) de ressonância de um spin próximo ou de outro grupo de spins equivalentes, em $n+1$ linhas (caso estejam acoplados), com uma distribuição de intensidade dada pelo “triângulo de Pascal”, em que cada entrada representa a soma das duas entradas imediatamente acima ¹⁹, vide figura 14(a). Para ilustrar, vide o espectro do etanol, figura 14(b), em que os prótons do metil (CH_3) acoplam-se com os do metileno (CH_2), gerando, um quarteto e um triplete.

Figura 14 - (a) À esquerda, a representação das relações entre as intensidades das multiplicações de um pico em um Triângulo de Pascal (coeficientes da distribuição binomial). Ao lado, há a correspondência de cada uma das linhas do Triângulo com a estrutura molecular que a gera, sendo A acoplado indiretamente ao(s) átomo(s) X, e todos com núcleos magneticamente equivalentes, além do nome dado ao número de linhas desdobradas. (b) Molécula de etanol com seu respectivo espectro. O espectro evidencia o acoplamento dos prótons equivalentes do metileno com os do metil.

A ressonância de um átomo X é a mesma em uma estrutura do tipo AX ou do tipo AX_n, pois um grupo de núcleos equivalentes ressoa como um único núcleo, um exemplo seria o próton do CH₃. A única diferença está na intensidade do pico de ressonância de X em AX_n, que será n vezes maior que em uma espécie AX¹⁹.

Espectros de RM são geralmente muito mais complexos do que a simples análise que fizemos até o momento. Nós descrevemos o caso extremo em que as diferenças nos desvios químicos são muito maiores do que as constantes de acoplamento escalar. Em tais casos, os espectros resultantes são chamados espectros de primeira ordem. Transições não podem ser alocadas a grupos definidos quando as diferenças nos seus desvios químicos são comparáveis às suas interações de acoplamento spin-spin. Os espectros complicados, que são então obtidos, são chamados espectros fortemente acoplados (ou ‘espectros de segunda ordem’) e suas análises se tornam bastante mais complexas¹⁹.

3.3 MRS *in vivo*

A MRS *in vivo* é uma técnica não invasiva e bem estabelecida para estudos de quantificação de metabólitos, taxas de reação química e bioenergética, além de suas variações

causadas por estímulos ou perturbação patológica em regiões espacialmente selecionadas de um determinado órgão, como, por exemplo, o cérebro²⁴.

Para a identificação dos metabólitos, por MRS, é necessário, primeiramente, adquirir um espectro, utilizando como frequência de transmissão e recepção a frequência de ressonância (ω_0) do núcleo atômico escolhido para análise. Para aplicação *in vivo*, os spins nucleares detectados de maior relevância metabolicamente são: ^1H , ^{13}C e ^{31}P .

MRS de ^1H é uma técnica poderosa para observar um grande número de metabólitos de importância biológica e importantes neurotransmissores, tais como glutamato (Glu) e GABA. Com excelente resolução espectral (obtida em altos campos magnéticos) permite detectar mais que 15 diferentes metabólitos em um cérebro normal²⁵.

MRS de ^{31}P fornece informações sobre metabólitos energeticamente importantes, também sobre o pH intracelular, a concentração de magnésio e fluxos de reação²¹. Uma característica bastante favorável é a dispersão dos *chemical shifts* dos fosfatos que é relativamente alta (~30 ppm), resultando em uma excelente definição dos picos, o que repercute na quantificação espectral²¹.

Já a MRS de ^{13}C permite não somente detectar diversos metabólitos, como glicogênio, mas, principalmente, analisar importantes vias metabólicas. Isto é feito através geralmente de infusão de substratos metabólicos marcados com ^{13}C , sendo a glicose frequentemente utilizada. A espectroscopia de ^{13}C auxilia, então, demonstrar em que grau o composto injetado foi metabolizado e ao longo de quais vias metabólicas. Por isto, ela é adequada para estudar a relação entre atividade neuronal, questões energéticas e o metabolismo da glicose, através de metabólitos resultantes ou associados do metabolismo, como, por exemplo, lactato, alanina, glutamato, glutamina (Gln), GABA, aspartato²⁶. Entretanto a sensibilidade do método é relativamente baixa: abundância natural de apenas 1,108% e baixa razão giromagnética comparada aos demais átomos, segundo expõe a tabela 1.

Ainda há outros tipos de spins nucleares também utilizados para espectroscopia *in vivo*, tal como ^{19}F , ^{23}Na , ^{39}K e ^{17}O , dos spins nucleares, contudo, o mais amplamente detectado nas clínicas é ainda o próton. MRS de próton é fornecida como opção pela maioria dos fabricantes e está se tornando cada vez mais comum na prática clínica, particularmente para aplicações neurológicas. Ela requer apenas um pacote de software e um *phantom* de teste, tornando a atualização mais fácil e menos cara para um sistema clínico de imagens por ressonância magnética. Não há necessidade, como para MRS de outros núcleos, de diferentes bobinas de RF para sintonizar na frequência de Larmor, pré-amplificadores de *matching*, híbridos, e um amplificador de potência de banda larga²⁷. Pacotes de software automatizam as

sequências de aquisição e pós-processamento. Além disso, o núcleo de hidrogênio é o mais sensível para RM, em termos de sensibilidade intrínseca (alta razão giromagnética), abundância natural (> 99,9%), e presença nas estruturas do corpo humano, vide tabela 1, facilitando, assim, aplicações diagnósticas abrangentes.

Tabela 1 – Propriedades de RM comumente encontrada em núcleos de estruturas *in vivo*. Está enfatizado o ^1H por ser o de maior concentração no corpo e o mais sensível para aplicações de RM.

Isótopo	Spin	Momento magnético	Razão giromagnética	Abundância no corpo humano
			($10^7 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$)	
^1H	1/2	2,793	26,752	88 M
^{31}P	1/2	1,131	10,841	75 mM
^{17}O	5/2	-1,893	-3,628	16 mM
^{19}F	1/2	2,627	25,181	4 μM
^{23}Na	3/2	2,216	7,08	80 mM

Cada metabólito possui como assinatura um conjunto único de picos centrados em frequências específicas (deslocamentos químicos), e a sua quantificação é feita através do valor de suas áreas. Os principais metabólitos medidos pela MRS de próton no cérebro incluem:

- N-acetil aspartato (NAA) - no espectro de MRS de ^1H de tecido cerebral normal, o pico de ressonância do grupo metil do NAA em 2,01 ppm é o mais proeminente ²³. Ele está localizado exclusivamente no sistema nervoso e periférico, e sua concentração varia nas partes distintas do cérebro. Apesar de alguns autores atribuírem possíveis funções para o NAA, sua exata função ainda não é conhecida. Para as aplicações MRS de ^1H *in vivo*, o pico de ressonância do NAA é usado como marcador de densidade neuronal, sendo observada uma queda na intensidade do NAA em doenças que induzem a perda neuronal. Além disso, estudos indicam que mudanças nos níveis de NAA podem indicar disfunções neuronais.
- N-acetilaspargilglutamato (NAAG) - provavelmente envolvido no processo excitatório da neurotransmissão ²⁷.
- Creatina (Cr) / Fosfocreatina - estão presentes no cérebro, no sangue e no músculo. A fosfocreatina é um reservatório de fosfato de alta energia para geração de trifosfato de adenosina (ATP). Nos espectros MRS de ^1H de tecidos

normais do cérebro, as ressonâncias em 3,03ppm (um proeminente singlete) e 3,93ppm vêm dos prótons metil e metileno da creatina e creatina fosforilada. Nos estudos de MRS de ^1H , os espectros da creatina e da fosfocreatina são muito parecidos, e a diferença é tão pequena *in vivo* que não permite a sua separação. Juntas elas são conhecidas como “creatina total” (tCr) e são encontradas no cérebro tanto em células gliais quanto neuronais. A concentração da creatina total é relativamente constante, sem sofrer mudanças com a idade ou com o aparecimento de doenças. Por este motivo, sua ressonância é frequentemente usada como referência interna de concentração.

- Colina (Cho) / Fosfocolina / Glicerofosforilcolina - associados com a integridade da membrana da célula glial. Além dos picos de ressonância do NAA e da creatina, o singlete em 3.2 ppm é um pico de amplitude relevante em comparação aos demais metabólitos. Para a sua formação, há contribuições da colina livre, glicerofosforilcolina e fosforilcolina, grupo geralmente conhecido como “colina total” (tCho). A colina é principalmente obtida sob a forma de fosfolipídios da dieta. É necessária para a síntese do neurotransmissor acetilcolina, e da fosfatidilcolina, um dos principais constituintes de membranas. Um aumento do sinal da colina é observado em doenças como Alzheimer²⁸ e câncer²⁹.
- GABA, Glutamato e Glutamina - importante na neurotransmissão, mas muito difícil de quantificar *in vivo*, devido aos multipletos e efeitos de acoplamento J. A separação das ressonâncias do glutamato e da glutamina é praticamente impossível em intensidades mais baixas de campo, ou seja, abaixo de 3 T. Devido a isto, quando se analisa os espectros, as suas contribuições *in vivo* são usualmente combinadas e denominadas 'Glx'. Estes metabólitos poder ser separadamente identificados *in vivo*, como já foi demonstrado, acima de 4 T²³.
- Mio-Inositol (M-Ins) - este composto pode ser detectado no cérebro através de aquisições de TE curto, embora o sinal normalmente atribuído ao M-Ins pode também conter menores contribuições monofosfato inositol, polifosfato inositol e glicina. Em MRS de próton, verifica-se um dubleto-de-dubletos centrados em 3,52 ppm e um tripleto a 3,61 ppm. Um tripleto menor reside em 3,27 ppm e geralmente é obscurecido pelos picos de ressonâncias da tCho³⁰. A função do M-Ins não é bem compreendida, mas acredita-se que seja um requisito essencial para o crescimento celular, regulação osmótica, e uma

forma de armazenamento de glicose. Tem sido proposto como um marcador glial. Níveis alterados têm sido associados com a doença de Alzheimer, encefalopatia hepática e lesão cerebral²³.

- Lactato (Lac) - indicativo do metabolismo anaeróbico³⁰.

A figura 15 ilustra o espectro dos principais metabólitos presentes em um cérebro de rato (que são os mesmos que os presentes no cérebro humano).

Figura 15- Exemplo de espectro de ^1H MRS in vivo de um cérebro de rato em 11,75 T (TR/TE=4000/12 ms).
Figura adaptada²¹.

Embora a aplicação de MRS de ^1H aos tecidos *in vivo* seja uma ferramenta poderosa, há diversos desafios a serem superados. Os mais simples são relacionados, por exemplo, ao fato da ressonância da água ser várias ordens de magnitude maior do que os metabólitos de baixa concentração, tornando a detecção dos metabólitos difícil e ambígua. Em segundo lugar, outros sinais grandes, como lipídios extracranianos também podem sobressair sobre pequenos sinais metabólicos, dificultando a quantificação destes e, em terceiro lugar, pequenas distribuições heterogêneas de campo magnético podem diminuir significativamente a resolução espectral. Por isso, a supressão de água, localização espacial, *shimming*, entre outras formas de otimização de campo, são pré-requisitos para estudos de MRS *in vivo* de ^1H e também de outros núcleos²¹.

3.3.1 Desafios da técnica

Um dos maiores desafios da MRS de próton *in vivo* é a medida e a identificação da contribuição individual de metabólitos em um espectro adquirido para tempo ao eco curto²³. Isto é principalmente devido à presença de numerosos grupos não resolvidos de multipletos, exibindo formato de linhas complexas e consideráveis sobreposição espectral, que é particularmente grave nos sistemas que estão clinicamente disponíveis para os estudos em seres humanos. Outras dificuldades são causadas por padrões espectrais variáveis causadas por susceptibilidades induzidas, distorções da linha de base devido à presença de ressonâncias largas das macromoléculas, lipídios e resíduo da supressão da água.

Com um TE de aproximadamente 30ms, por exemplo, metabólitos cerebrais com T_2 curto são observados concomitantemente àqueles com T_2 longo. Isso dificulta a avaliação apropriada da contribuição individual de cada um dos metabólitos e, por consequência, sua quantificação.

Há diversos recursos de pré-processamento e processamento que foram desenvolvidos para ajudar na identificação e quantificação mais acurada dos dados, que serão discutidos nas seções 3.4.3 e 3.4.4. Embora todos eles facilitem uma quantificação mais confiável, especialmente para a análise de multipletos e remoção de distorções de base, cada qual tem suas limitações e seus pré-requisitos para uma eficiência adequada.

Ademais, a necessidade de tempos de aquisição (TAs) curtos, como em experimentos de carácter funcional, pode comprometer a qualidade dos espectros obtidos. Esta dificuldade está estritamente associada ao método de análise espectral atualmente utilizado, baseado no formalismo de Fourier¹.

Uma imposição extremamente rígida do formalismo de Fourier, a relação de incerteza determina que a máxima resolução espectral só possa ser obtida com aquisições de sinais cuja duração seja maior que o inverso da menor separação entre linhas espectrais (este princípio será mais bem fundamentado na seção 3.4.2). Considerando o número de médias necessárias à aquisição de um dado com suficiente relação sinal-ruído (SNR, *Signal-to-Noise Ratio*), o TA adotado nas sequências e, por consequência, os parâmetros associados à resolução espectral, normalmente estão bem abaixo do necessário para resolver multipletos. Isso compromete significativamente a quantificação de metabólitos clinicamente importantes como o M-Ins, por exemplo, cujo espectro apresenta múltiplas linhas. Entretanto, para diagnósticos clínicos, é importante que sua quantificação seja adequada e feita com acurácia.

Outra limitação, associada à restrição de TA mínimo, é a dificuldade de se estabelecer experimentos *in vivo* para a análise da variação dinâmica de metabólitos em pesquisas de caráter funcional, uma vez que estas variações ocorrem numa duração inferior àquela admitida pela resolução máxima permitida pelo uso do formalismo de Fourier. No que se refere às aplicações no cérebro, os tempos totais de aquisição de experimentos de espectroscopia são da ordem de vários minutos para que a resolução espectral desejada seja alcançada. Este tempo é, entretanto, incompatível com os tempos característicos da evolução de metabólitos em resposta a estímulos funcionais, seja através de excitação direta, por exemplo, do córtex visual, motor ou auditivo, ou através de paradigmas que induzam atividade através de processos cognitivos.

3.4 Quantificação espectral

O espectro obtido pela espectroscopia de RM pode, em princípio, ser utilizado para derivar as concentrações absolutas. Isto origina do fato de que a magnetização do equilíbrio térmico, M_0 , é diretamente proporcional ao número de spins, tal como exposto na seção 2.2, e, consequentemente, à concentração molar. No entanto, em uma experiência de RM, M_0 não é detectada diretamente, mas sim uma corrente induzida, proporcional à magnetização transversal. A equação (33) expressa esta relação. Embora pareça simples através do sinal determinar a magnetização, os fatores que descrevem as modulações de sinal devido à sequência de pulso RM e a bobina de RF são difíceis de definir. Eles dependem de parâmetros da sequência, por exemplo, TR, TE, o número e tipo de pulsos de RF, T_1 e T_2 , associados a fatores relacionados com a geometria e a qualidade da bobina de RF, tal como o fator de qualidade Q ²¹. Uma parcela destes parâmetros, a maioria das vezes, não é conhecida pelo usuário, o que impossibilita o cálculo direto da concentração dos metabólitos.

Um composto de referência poderia ser utilizado, cuja concentração é conhecida. Entretanto, seria necessário fazer diversas correções (como em T_1 , T_2 , difusão, suscetibilidade magnética, entre outros), sendo, na prática, bastante demorado. Como alternativa, especialmente para o uso de MRS na clínica, usa-se razões entre as áreas dos espectros dos metabólitos, uma vez que os fatores de correção são idênticos para ambos os metabólitos e a razão destes não possui sensibilidade aos parâmetros desconhecidos citados anteriormente. No

entanto, ao contrário de concentrações absolutas, razões metabólicas não podem dar informações inequívocas sobre alterações metabólicas, como encontradas em muitos distúrbios e patologias estudadas com RM *in vivo*. Por exemplo, um aumento significativo na proporção de colina para creatina poderia significar que (1) a concentração de colina aumentou, (2) a concentração de creatina diminuiu, (3) tanto a concentração de colina e creatina foram alterados ou (4) os parâmetros de relaxação para um ou ambos os metabólitos foram alterados ²¹. Para estudos conclusivos é necessário determinar os valores absolutos dos metabólitos.

A figura 16 ilustra um diagrama de fluxo que representa todos os procedimentos que precisam ser feitos para a quantificação absoluta dos metabólitos, podendo ser decomposto em quatro etapas separadas: Aquisição, Pré-Processamento, Processamento e Correção e Calibração dos dados.

Durante a etapa de aquisição de dados, a magnetização longitudinal no volume de interesse é convertida em magnetização transversal, o que gera um FID na bobina receptora (seção 3.4.1).

Conforme já discutido anteriormente, o FID adquirido é um sinal no domínio no tempo. Para facilitar sua análise e visualização, é comum visualizarmos essa informação no domínio espectral de frequências. Para isso, é comum utilizarmos a Transformada de Fourier, cujo resultado compreende os respectivos dados no domínio da frequência, conhecido também como espectro. Devido à sua importância, inclusive para o presente trabalho, o formalismo de Fourier será tratado em numa seção específica (3.4.2).

Antes das ressonâncias poderem ser quantificadas, o sinal é muitas vezes pré-processado (seção 3.4.2), durante o qual várias melhorias podem ser feitas, normalmente relacionadas com as formas das linhas de ressonância, além de possibilitar a remoção de sinais inconvenientes, como a linha de base e o pico residual da água. Posteriormente, é feita a quantificação de forma relativa através das razões entre as áreas de ressonância dos metabólitos. A seção 0 fornecerá uma visão geral dos algoritmos de processamento de dados mais comumente usados.

É importante dizer que as etapas do pré-processamento e quantificação dos metabólitos podem ser realizadas tanto no domínio do tempo, quanto no domínio da frequência. Quais os procedimentos podem ser feitos em cada domínio e as vantagens e desvantagens serão abordadas nos tópicos seguintes.

Figura 16 – Diagrama de fluxo contendo as etapas para o processamento e quantificação dos dados.

A etapa final resume-se na determinação do termo de correção para os sinais de referência e dos metabólitos. Isso inclui correções para T_1 , T_2 , B_1 e outros parâmetros relacionados. Finalmente, as concentrações absolutas dos metabólitos podem ser calculadas. Este último procedimento não será detalhado neste trabalho, apenas os três primeiros, para contextualizar os procedimentos experimentais e o método de quantificação relativa utilizado.

3.4.1 Aquisição dos dados

O primeiro e, possivelmente, o mais importante passo na obtenção acurada das concentrações dos metabólitos diz respeito à aquisição adequada do sinal no domínio do tempo. A qualidade do sinal adquirido em termos de sensibilidade, resolução, artefatos e conteúdo de informação influenciam, diretamente, no nível de precisão e confiabilidade da

quantificação. De forma resumida, as características importantes a serem seguidas durante a aquisição de dados são:

- Homogeneidade do campo magnético: um dos parâmetros mais importante na determinação da qualidade espectral. A falta de homogeneidade no campo magnético externo na região de interesse produz alargamento das linhas espectrais e, portanto, uma diminuição da resolução espectral.
- Precisão na localização espacial. A localização espacial precisa eliminar os sinais indesejados do exterior do volume de interesse, além de um posicionamento reprodutível do *voxel*. Mais detalhes da sua importância serão fornecidos na próxima seção.
- Qualidade na supressão da água. A qualidade da supressão da água está muitas vezes diretamente relacionada com a homogeneidade do campo magnético, bem como com a qualidade da localização espacial.
- Alta sensibilidade. Ela determina diretamente a precisão pela qual os parâmetros podem ser calculados a partir dos dados. Dado um determinado nível de ruído, parâmetros, tais como a amplitude e a frequência, apenas podem ser estimados com certa precisão, independentemente do método de quantificação empregado. Portanto, quando o SNR mínimo para estimar um determinado parâmetro com uma determinada precisão não pode ser conseguido, apenas uma mudança na aquisição de dados pode melhorar os dados.

As sequências de pulsos mais utilizadas para MRS *in vivo* para a localização espacial e supressão de água, serão tratados nos tópicos seguintes.

3.4.1.1 Sequência de Pulsos

Para a aquisição de um espectro de qualidade é necessário, inicialmente, escolher cuidadosamente a sequência de pulsos RF e especificar os parâmetros mais adequados para o experimento, considerando, para tal, a faixa em que se encontram os valores de T_1 e T_2 das substâncias químicas que se deseja analisar. Empregar localização espacial acurada e de alta qualidade é essencial para a obtenção de dados de MRS de próton *in vivo* sem artefatos

provenientes dos lipídios do crânio e passível de quantificação. Além disso, cada região cerebral possui uma concentração bioquímica específica, e a soma de suas contribuições traria pouca informação relevante.

As sequências existentes podem ser classificadas em duas modalidades, MRS de volume único (SVS) e *multi-voxel* (MRSI), conforme a técnica de localização espacial empregada. Na SVS, um volume de interesse (VOI) é selecionado através de pulsos de RF seletivos e gradientes, e em MRSI, vários *voxels* são adquiridos em um único experimento, por meio de gradientes de codificação de fase. Embora haja uma cobertura espacial maior de processos patológicos, facilitando sua compreensão, a aplicação de MRSI possui diversas limitações em relação à SVS, cujas vantagens impactam na precisão e qualidade das linhas espectrais, tais como: um *shimming* mais eficiente (consequentemente, campo mais homogêneo), melhor supressão de água, localização espacial mais explícita e tempo total de aquisição mais curto ³¹. No entanto, apenas um espectro de uma região específica pode ser obtido por experimento de RM. Devido a sua importância, dedicaremos um tópico para SVS, abordando sucintamente as metodologias mais comuns e com mais profundidade a técnica aplicada nos procedimentos experimentais.

3.4.1.2 *Localização por Volume Único*

A localização obtida pelos métodos de SVS envolve, geralmente, uma seleção de três planos ortogonais, e o tamanho e a posição da VOI são facilmente controláveis. Dentre as várias sequências de SVS, as mais notáveis são: *Image Selected In Vivo Spectroscopy* (ISIS) *Stimulated, Echo Acquisition Mode* (STEAM) ³² e PRESS ³³.

O método ISIS foi inicialmente proposto para observação de linhas cujos T_2 são muito curtos, como, por exemplo, as linhas do ATP para MRS de ^{31}P . Ele obtém uma localização espacial completa em oito médias e é menos sensível a imperfeições dos gradientes. No entanto, os dados podem sofrer vários tipos de contaminações por sinais indesejados, originários, por exemplo, de compostos com tempos de relaxação T_2 curtos ou devido a artefatos devido à relaxação incompleta de T_1 ²¹. Além disso, a técnica é bastante sensível a efeitos de movimento. Melhores espectros podem ser produzidos com a STEAM e a PRESS.

A técnica STEAM utiliza-se do efeito de eco estimulado, que ocorre após a aplicação de três pulsos sucessivos de 90° . A principal vantagem em relação à PRESS é a redução do TE mínimo, embora, a intensidade máxima do sinal frequentemente seja apenas metade do que se obteria aplicando a PRESS no mesmo *voxel* e para o mesmo TE ²¹. Para gradientes magnéticos fortes e rápidos, encontram-se, na literatura, relatos de espectros com TE de 1 ms ³⁴.

A sequência de pulsos utilizada no trabalho foi a PRESS, pela sua robustez e melhor SNR comparada às demais, e por isto, iremos aprofundar um pouco mais. A técnica de localização PRESS é também denominada Spin Eco Duplo, em que a excitação seletiva da fatia, com um pulso de 90° , é combinada com dois pulsos seletivos de 180° de refocalização (figura 17).

Figura 17 Diagrama da sequência de pulsos de RF e gradientes utilizados para localização 3D do método PRESS. Ao aplicar um pulso de RF e um gradiente simultaneamente, excita-se spins (pulso de 90°) ou refocaliza-se os spins já excitados (pulso de 180°) pertencentes ao plano que intersecta a direção do gradiente. (b) As cores verde, azul e vermelho, identificam regiões em que os spins são excitados ou refocalizados pelos pulsos de RF aplicados paralelamente com gradientes nas direções x, y e z, respectivamente. Ilustrando, assim, cada fase do processo de seleção. A região vermelha corresponde ao *voxel* final (intersecção dos três planos), aonde será formado um eco de spins após um TE, induzindo um FID na bobina receptora.

Na figura 17, os três pulsos RF podem ser vistos. Cada um deles é aplicado simultaneamente com um gradiente de campo em uma direção distinta. Quando o primeiro pulso de 180° é executado depois de um tempo $t_1/2$ em relação ao pulso de excitação, um eco

é formado em t_1 (magnetização transversal é produzida dentro de uma fatia perpendicular ao eixo x). A magnetização começa, então, a defasar. A aplicação do segundo pulso de 180° , transcorrido $t_2/2$ após a formação do eco, irá refocalizá-lo, de modo que o eco final é formado e registrado no momento $t_1 + t_2$ (que é igual ao TE). O primeiro sinal de eco, que não é adquirido, provém de uma coluna formada na intersecção entre duas fatias ortogonais selecionadas pelo pulso de 90° e o primeiro pulso 180° . O segundo eco contém apenas o sinal do volume disposto na intersecção dos três planos selecionados pelos três pulsos de RF, ou seja, é a VOI inicialmente planejada pelo usuário. Todas as outras partes da amostra que foram excitadas por alguns dos pulsos, mas não necessariamente pelo conjunto dos três pulsos, irão defasar e não contribuirão para o sinal.

É importante dizer que a ordem dos gradientes que aparece no diagrama representativo da sequência PRESS na figura 17 é apenas um exemplo e pode ser alterada. Como também o formato da VOI. Nos exames clínicos, a espessura da fatia de todos os três pulsos RF pode ser escolhida de forma independente, como também o ângulo entre elas, possibilitando VOIs na forma de paralelepípedos ³⁵. Gradientes diferentes são gerados pela combinação dos gradientes x, y e z.

A aquisição de dados em sequências de espectroscopia começa principalmente no centro do eco de spin e dura várias centenas de milissegundos. Isto é necessário para possibilitar a análise de pequenas diferenças de frequência de alguns Hertz no *chemical shift* das moléculas observadas ³⁵.

Para avaliar a qualidade da espectroscopia de *voxel* único, um dos parâmetros mais importantes de ser analisado é a seletividade volumétrica do sinal adquirido. Deve-se evitar qualquer sinal das regiões fora do volume de interesse. A primeira etapa para alcançar este objetivo é dissipar a coerência dos spins de regiões indesejadas, e para isto, podem-se aplicar gradientes, conhecidos como *spoiler gradients*. Em MRS de ^1H do cérebro tal estrutura crítica é a gordura subcutânea do crânio, que, frequentemente, se encontra próxima da VOI e gera um sinal muito forte em comparação ao sinal dos metabólitos a serem examinados.

Outra fonte de contribuição de sinais indesejados decorre do fato de que os pulsos de RF de duração limitada, não conseguem excitar de forma retangular a fatia. Os seus perfis reais apresentam uma diminuição perto das bordas do lado de dentro da fatia excitada, e próximo das bordas pelo lado de fora há uma pequena excitação residual. Este artefato pode ser reduzido pela aplicação de pulsos para a supressão de volume externo (OVS, *Outer Volume Suppression*) ³⁵.

3.4.1.3 Supressão da água

A supressão de uma ressonância em particular em um espectro de RM requer uma diferença em alguma propriedade entre o composto que está interferindo na detecção e a molécula de interesse. Um exemplo típico em MRS *in vivo* é a supressão da água. Neste caso, a concentração da água é, frequentemente, mais que 10.000 vezes maior do que a dos metabólitos, e, sua supressão elimina distorções de base e sinais espúrios, conduzindo a uma aquisição mais confiável e consistente do espectro dos metabólitos ²¹. Os métodos de supressão de água existentes empregam diferentes técnicas, sendo as mais conhecidas as de: (1) excitação ou refocalização, com pulso espectralmente seletivo, (2) análise de diferenças nos parâmetros de relaxação, (3) edição espectral ²¹. Os dois métodos utilizados neste trabalho são baseados nas metodologias (1) e (2), e por isto, serão melhores abordados nos próximos parágrafos.

Uma das escolhas mais comuns para supressão de água é a denominada supressão espectral, que utiliza um pulso de RF seletivo para suprimir componentes espectrais específicas do sinal. Nesse caso, a diferença de *chemical shift* entre a água e as demais ressonâncias, fornece subsídio para definição das características desse pulso de supressão. Como ponto negativo, essa abordagem possui o fato de que as ressonâncias muito próximas da ressonância da água também são suprimidas.

Em essência, o pulso seletivo de RF excita a água para o plano transversal, seguido pela destruição das coerências por um gradiente de campo magnético (que chamaremos de elemento de supressão). Esta sequência foi descrita originalmente por Haase *et al.* ³⁶ e foi nomeado *Chemical Shift Selective* (CHESS). Há outras sequências de supressão que aplicam pulsos seletivos de excitação, como também de refocalização com spin-eco (utilizado para prolongar o TE mínimo), mas que não serão citadas neste trabalho, uma vez que podem ser encontradas na literatura ³⁷⁻³⁹.

Uma das principais vantagens do CHESS é que ele pode preceder qualquer sequência de pulso, uma vez que não perturba as ressonâncias dos metabólitos. Entretanto, para evitar a recuperação do sinal de relaxação por T₁ da água, a duração do pulso e o intervalo entre o módulo CHESS e a excitação dos metabólitos devem ser tão curtos quanto possível.

A eficiência da supressão da CHESS depende claramente da capacidade do pulso de RF de gerar magnetização transversal para todos os spins da água da VOI. Portanto, a

homogeneidade do B_0 e do B_1 é crucial para a supressão da água adequada. Um único elemento base (pulso RF + gradiente) do CHESS seria suficiente se B_0 e B_1 fossem idealmente homogêneo. Na prática, contudo, o elemento da CHESS é repetido duas a seis vezes para melhorar a supressão de água. Quanto maior o número de elementos de repetição da CHESS, mais larga e achatada é a gama de frequências de ressonância em torno da água, de modo que a supressão se torna menos sensível em relação a pequenos desvios na frequência causados pela falta de homogeneidade do campo magnético B_0 . Além disso, os elementos adicionais reduzem a sensibilidade em relação à inhomogeneidade de B_1 . Considerações teóricas e práticas de aplicação do CHESS podem ser encontradas de forma vasta na literatura.

Para algumas aplicações específicas, a relaxação longitudinal e/ou transversal pode ser utilizada para discriminar entre a água e outras ressonâncias, como, por exemplo, ressonâncias de metabólitos próximos a da água, mas com tempos de relaxação suficientemente diferentes²¹. A maioria dos métodos baseados em relaxação faz uso de diferenças de T_1 , por ser uma vantagem em relação aos métodos seletivos de frequência, descritos anteriormente, que são degradados pela relaxação T_1 .

Um desses métodos, baseado na técnica CHESS, *Variable Pulse Powers and Optimized Relaxation delays* (VAPOR)³⁴ combina a supressão da água baseada em T_1 com a otimização do pulso espectralmente seletivo para fornecer excelente supressão com uma grande insensibilidade para a inhomogeneidade de T_1 e de B_1 ²¹. Ele é composto por sete pulsos de RF espectralmente seletivos intercalados com intervalos de recuperação de T_1 . Portanto, para amostras com longos valores de T_1 , é recomendado usar a supressão VAPOR. Já o CHESS, sugere-se aplicá-lo para tempos de repetição curtos.

A maioria dos estudos de MRS de próton foca em suprimir seletivamente a ressonância da água e observar sem ambiguidade as ressonâncias do metabólito. No entanto, a detecção da ressonância da água pode ser muito útil como (1) referência interna para concentração, (2) correção de correntes induzidas e vibrações, (3) correção de fase automática e (4) monitoramento e correção das pequenas oscilações do campo magnético estático²¹.

3.4.2 Transformada de Fourier

Há inúmeras aplicações da Transformada de Fourier, entre elas, a conversão dos dados dos FIDs, que estão no domínio do tempo, para o domínio da frequência, permitindo assim avaliar as informações relevantes sobre os spins nucleares, tais como frequências de ressonância e abundância relativa.

A FT tem sido muito utilizada para a caracterização de sistemas lineares e para a identificação dos componentes de frequência que compõe uma função contínua que pode ser representada como uma soma de exponenciais complexas. No entanto, quando esta função é amostrada e/ou digitalizada, é a versão finita e discreta da Transformada de Fourier que deve ser aplicada, isto é, a DFT. Já a Transformada Rápida de Fourier (FFT, *Fast Fourier Transform*) é simplesmente um método eficiente para o cálculo da DFT. A FFT deve ser usada no lugar da transformada discreta de Fourier quando se deseja uma redução substancial no tempo de computação, embora seja limitado a um número de amostras que correspondam a alguma potência de dois. Para os algoritmos mais atuais, já não é necessário este pré-requisito, basta que os dados estejam igualmente espaçados nos domínios direto e recíproco.

A FT do sinal, $f(t)$, resulta na $F(\nu)$ ou na $F(\omega)$ de acordo com a equação:

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{-i2\pi\nu t} dt \quad \text{ou} \quad F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt, \quad (38)$$

lembrando que $\omega = 2\pi\nu$. Como a FT é uma transformação unitária (isto é, uma transformação que preserva o produto interno: o produto interno de dois vetores antes da transformação é igual ao seu produto interno, após a transformação.), o sinal no domínio do tempo pode ser calculado a partir do sinal no domínio da frequência, com a FT inversa, dada por¹⁶:

$$f(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(\nu)e^{+i2\pi\nu t} d\nu \quad \text{ou} \quad f(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} F(\omega)e^{+i\omega t} d\omega, \quad (39)$$

A FT opera em ambas as direções, podendo ocorrer transformações de FID em espectro, ou, de espectro em FID, sem nenhuma perda de informação.

Ao aplicar a FT sobre o FID, esta se decompõe em componentes individuais e que possuem, cada uma, um pico com uma dada amplitude e posição no eixo da frequência. Similarmente ao FID, o espectro também pode ser representado por partes real e imaginária, que em situações ideais de experimento, são linhas lorentzianas de absorção e dispersão, respectivamente, como esquematizadas na figura 18.

A forma lorentziana se deve ao aspecto exponencial do FID, ocorre idealmente em líquidos, mas, na prática, podem ocorrer picos com outros formatos, tais como Gaussiano, devido a diversos fatores, como, por exemplo, presença de inhomogeneidade no campo.

Figura 18 - FID ideal em que a sua FT produz uma parte real absorptiva, e uma parte imaginária dispersiva.

Em um FID experimental, a parte real e a imaginária não correspondem, necessariamente às componentes absorptiva e dispersiva, respectivamente. Sempre que a fase inicial de um FID não for zero ($\phi_0 \neq 0$), após a aplicação a FT, os canais real (R) e imaginário (I) conterão uma mistura da componente absorptiva (A) com a dispersiva (D) da função lorentziana:

$$\begin{aligned} R(\omega) &= A(\omega) \cos(\phi_0) - D(\omega) \sin(\phi_0) \\ I(\omega) &= A(\omega) \sin(\phi_0) + D(\omega) \cos(\phi_0) \end{aligned} \quad (40)$$

Logo, para visualizar a parte real e imaginária do espectro como ilustrado na figura 18 é necessário fazer a correção de fase do espectro, como será abordado na seção 3.4.3. A análise espectral é geralmente realizada após a correção de fase, sobre a parte real.

As excelentes características de um algoritmo de FT (como o FFT) incluem: alta eficiência, robustez e, mais importante, a FT não tem parâmetros de entrada e pode ser utilizada como uma “caixa preta” no software, eliminando, assim, oportunidades para a tendenciosa intervenção humana. Isto implica que para um determinado conjunto de dados, independente de onde, como e por quem é utilizada a FT, ela deve sempre resultar em um espectro único. Além disso, devido à sua natureza linear, a FT é estável com relação às variações do sinal, o que permite que o ruído no domínio do tempo seja linearmente convertido para o domínio da frequência. É por esta razão que as espectroscopias fundamentadas no formalismo de Fourier são robustas e amplamente utilizadas.

Uma das medidas mais importante da qualidade de um espectro é a resolução. A resolução se refere à capacidade de distinguir componentes do sinal próximas em frequência. Ela pode ser intrinsecamente determinada pelo sinal, ou pelo sistema físico subjacente e as técnicas experimentais usadas para sondar e detectar o sinal. Também é frequentemente afetada pelo método numérico usado para obter a representação espectral. A resolução espectral digital (RD) obtida através da DFT, é:

$$RD = \frac{2 \cdot BW}{N_p} = \frac{1}{t_{AQ}}, \quad (41)$$

sendo SW a janela espectral (frequência de digitalização do sinal no domínio do tempo), N_p , o número de pontos digitalizados e t_{AQ} , o tempo total de aquisição. Portanto, a resolução digital pode ser melhorada com a diminuição de SW e aumento do N_p , ou, simplesmente, aumentando o t_{AQ} .

Esta relação inversa e nada favorável à aquisição de FIDs em MRS *in vivo*, em que para aquisição de um sinal com resolução espectral excelente é necessário um tempo de aquisição grande, é explicada pela relação de incerteza da FT.

Devido à enorme diversidade de técnicas de RM, apesar do grande sucesso do algoritmo de FT, existem situações em que a análise espectral dos dados no domínio do tempo pode se tornar uma tarefa árdua, às vezes insolúvel, pelo formalismo de Fourier. Exemplo destas limitações está relacionado à relação de incerteza da FT e artefatos gerados pelo truncamento do FID que serão explicados no próximo tópico.

3.4.2.1 Limitações da FT

Uma das maiores limitações da análise espectral ocorre quando o sinal é truncado antes dele decair totalmente a zero, ou, em experimentos reais, cair para o nível do ruído. O efeito do truncamento pode ser modelado como uma função retangular, $r(t) = 1$ para $|t| \leq T_{\max}$, e $r(t) = 0$ para $|t| > T_{\max}$. O sinal adquirido $c(t)$ pode ser representado como um produto do sinal, $s(t)$, com t tendendo a ∞ , e a função degrau $r(t)$: $c(t) = s(t)r(t)$. De acordo com o teorema de convolução, o resultado do espectro finito da FT é dado por:

$$I(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} s(t)r(t)dt = S(\omega) * \text{sinc}(T_{\max}\omega), \quad (42)$$

onde $\text{sinc}(x) = \text{sen}(x)/x$ e o símbolo (*) denota o operador de convolução. A convolução do sinal com a função sinc tem duas consequências diretas no espectro da FT de tempo finito:

- (a) Produz várias oscilações - artefatos na linha de base devido ao truncamento (oscilações de Gibbs ou *sinc-wiggles*),
- (b) Alarga todos os picos, redimensionando-os para, pelo menos, a largura central do envelope da função sinc. Esta relação indireta entre o aumento da imprecisão da frequência para um tempo menor de aquisição ou um comprimento menor de sinal é devido à relação de incerteza tempo-frequência da FT.

A partir deste princípio, a relação entre o tempo e a frequência, proporcionada pela FT, para qualquer função ou sinal $s(t)$ dependente do tempo é:

$$T \cdot B \geq \frac{1}{2} \quad (43)$$

Sendo:

$$T^2 = \sigma_t^2 = \int (t - \langle t \rangle)^2 |s(t)|^2 dt \quad (44)$$

$$B^2 = \sigma_\omega^2 = \int (\omega - \langle \omega \rangle)^2 |S(\omega)|^2 d\omega \quad (45)$$

$S(\omega)$ é a FT de $s(t)$, T , a duração eficaz do sinal, σ_t , o desvio padrão do tempo (t), B , a largura de banda eficaz do sinal e σ_ω , o desvio padrão da frequência (ω)⁴⁰.

A equação (43) implica em uma resolução simultânea de tempo e frequência para o sinal adquirido. Obtêm-se uma boa resolução de frequência a custo de resolução temporal, e vice-versa. Portanto se observarmos o sinal somente por um período finito, estaremos perdendo informação das frequências que o compõe. Um exemplo que isto ocorre é na aplicação de Transformada de Fourier Janelada (*Short-Time Fourier Transform*) e na aquisição de FIDs truncados no tempo.

A figura 19 exemplifica os efeitos do truncamento, as oscilações de Gibbs, o alargamento dos picos, citados anteriormente, e a perda de resolução. No gráfico, é comparada a FT do sinal adquirido de forma ideal e a FT do sinal com truncamento em 12,5% do tamanho original.

Figura 19 – FIDs processados pela FT para compreensão dos efeitos de truncamento. (a) Simulação de um FID formado pela sobreposição de dois, cujas frequências são de 4.9 e 5.0 Hz; amortecimento: $1/\gamma = 10.0$; *dwell time* = 0.06 s. O sinal em preto é o FID completo (simulado todos os pontos até seu relaxamento completo). O FID vermelho é o original truncado em 12,5% do tamanho inicial. Já o azul é idêntico ao vermelho, mas com preenchimento de zeros até 1024 pontos, a fim de melhorar a interpolação. (b) É possível visualizar as linhas alargadas e em sobreposição no espectro vermelho, devido à Relação de Incerteza do formalismo de Fourier e, no azul, as oscilações de Gibbs. Em ambos, é impossível resolver o dubleto observado no espectro preto.

As *sinc-wiggles* são desfavoráveis, pois obscurecem os picos menores próximos a picos maiores. Para minimizar este problema utiliza-se a técnica de apodização que consiste

na aplicação de um filtro de pós-processamento que, como efeito colateral, produz um alargamento adicional em todos os picos.

Para lidar com estas limitações da FT, como a redução de resolução descrita para FIDs truncados, este projeto propõe uma solução baseada no formalismo do FDM e KBDM, que será descrito no capítulo 4.

3.4.3 Pré-processamento dos dados

Pré-processamento significa qualquer manipulação realizada no sinal de RM a fim de melhorar a precisão da estimativa de parâmetros do sinal. Graças à correspondência entre o FID e o espectro, geralmente feita pela FT (seção anterior), os parâmetros do sinal de RM podem ser calculados, em princípio, tanto para um, quanto para o outro domínio, de forma equivalente. Diferentes técnicas de pré-processamento podem ser necessárias, dependendo em qual domínio o sinal é quantificado. Entretanto, algumas das etapas podem ser aplicadas em ambos os domínios, com resultados equivalentes ou semelhantes. Abaixo serão abordadas algumas das técnicas mais importantes para MRS de ^1H *in vivo* (correção de fase, preenchimento de zeros, correção da forma da linha e da linha de base, e remoção do pico residual da água).

3.4.3.1 Correção de fase

Nos experimentos de RM, geralmente, as fases iniciais de diferentes compostos do FID são diferentes de zero, resultando em um espectro formado por uma mistura de componentes absorptivas e dispersivas. Para as quantificações feitas no domínio da frequência, é necessário que o espectro real seja composto apenas por lorentzianas absorptivas, e o imaginário, por lorentzianas dispersivas. Para isto, aplica-se uma correção especial denominada correção de fase.

Matematicamente a correção consiste na multiplicação do espectro complexo pelo fator de fase complexa ($e^{-\phi_c i}$) igual à fase inicial do FID ($\phi_c = \phi_0$). Uma vez que o valor do

fator de fase a priori não é conhecido, a correção é feita iterativamente, observando a parte real (ou imaginária) do espectro e multiplicando o espectro pelo fator de fase, variando o valor de ϕ_c até que a forma absorptiva pura (ou dispersiva) seja restaurada ⁴¹. Esta correção é constante para todas as frequências, e é conhecida como correção de fase de ordem zero.

Devido a imperfeições de hardware e/ou erros de temporização, a fase ϕ_c pode ter uma componente (ϕ_1) que dependa da frequência de ressonância ω , desta maneira, diferente para cada pico do espectro. Além da correção de ordem zero, neste caso, será preciso recorrer à correção de primeira ordem. Uma boa aproximação é considerar ϕ_1 linearmente dependente da frequência, consequência, por exemplo, do início das aquisições em um tempo ligeiramente diferente de zero. Assim, a fase final será dada por:

$$\phi_c = \phi_0 + \phi_1(\Omega - \omega_0), \quad (46)$$

sendo Ω a frequência de referência ajustável no detector de fase.

Deve-se ressaltar que o ajuste da fase global é efetuado separadamente para as fases de ordem zero e primeira ordem.

3.4.3.2 Apodização

A apodização é a multiplicação do sinal de RM no domínio do tempo por uma função particular, com o objetivo de: (1) melhorar da SNR, (2) melhorar a resolução espectral, (3) remover artefatos de truncamento, ou (4) remoção de componentes espectrais cujas larguras de linhas são muito largas comparadas as dos metabólitos do domínio de frequência. Em MRS *in vivo*, os filtros mais comuns são funções que decaem com o tempo, de modo que o sinal é mantido no início do FID e é progressivamente suprimido, até que no final, região de SNR insignificante, é completamente suprimido. Isto melhora o SNR, embora à custa de algum alargamento das linhas espectrais ⁴².

O filtro exponencial ²³, seria um exemplo bastante utilizado:

$$F(t) = e^{(-\pi Lt)}, \quad (47)$$

onde L é a largura à meia altura (FWHM, *Full Width at Half Maximum*) do filtro, e a constante de tempo do filtro é $T = \frac{1}{\pi L}$.

É importante mencionar também que a filtragem do sinal introduz ruído correlacionado. Como resultado, alguns dos métodos estatísticos utilizados para o ajuste do sinal, que pressupõem que o ruído no sinal é descorrelacionado podem originar resultados falsos se uma filtragem intensa foi aplicada aos dados antes do ajuste⁴¹.

3.4.3.3 *Preenchimento com zeros*

Para a aquisição do FID, deve-se estudar, inicialmente, quais valores assumir para o *dwell time* (variação temporal entre sucessivos pontos), que determina a largura de banda (BW), e para o número de pontos amostrados (e consequentemente para o tempo total da aquisição, t_{AQ}), que define a resolução espectral, como salientado na equação (41). O espectro, devido ao uso da FT, conterà o mesmo número de pontos que o FID, e será construído pela interligação dos mesmos. Assim, pode ocorrer do experimento de MRS, cuja associação da resolução espectral com a largura de banda é definida pelo usuário, resultar em um número insuficiente de pontos amostrados para uma representação íntegra do sinal. Isto é especialmente relevante para os picos estreitos no espectro, os quais precisam de uma densidade maior de pontos, se comparados a outras regiões do espectro, para graficar corretamente a altura dos picos, formas e posições⁴¹.

Uma solução é alterar alguns parâmetros da sequência, de forma a reduzir a largura de banda e/ou aumentar o tempo de aquisição. No entanto, o *aliasing* limita o aumento na resolução espectral através da diminuição da largura de banda. Aumentando o tempo de aquisição irá levar a um aumento de armazenamento de dados e tempo total do experimento, além de um aumento da contribuição relativa de ruído, uma vez que a intensidade do sinal diminui com o aumento do tempo de aquisição²¹.

Existe a possibilidade, também, de aumentar o número de pontos do sinal artificialmente após a aquisição, sem precisar refazer os experimentos alterando os parâmetros da sequência. Esta técnica é denominada preenchimento com zeros (*zero filling*) e consiste da colocação de zeros após o último ponto medido do FID. Como resultado, o espectro, calculado pela FT sobre o sinal, é interpolado com o número total de pontos (igual ao número

inicial de pontos mais o número de zeros acrescentados) ⁴³. A figura 19, do tópico 3.4.2.1, exemplifica este conceito, uma vez que o número de pontos do FID com truncamento (cor vermelha) era muito pequeno para representar corretamente todos os artefatos do truncamento. Embora o acréscimo de zeros permita aumentar artificialmente o tempo de aquisição, como pode se observar (cor azul), ele não é capaz de compensar a falta de sinal, deste modo, ele não contribui em nada para a resolução espectral (o dubleto, por exemplo, permaneceu não resolvido – espectro azul). O que o preenchimento fez foi apenas melhorar a visualização das oscilações de Gibbs causadas pelo truncamento, que no sinal original truncado (cor vermelha) não é possível distinguir.

Deve-se enfatizar que acrescentar zeros ao final do FID adquirido não irá trazer nenhuma informação nova ao sinal. A este respeito, a FT do sinal, com preenchimento de zeros, continuará fazendo uso da informação já presente no sinal adquirido. Portanto, o acréscimo de zeros não altera a resolução real do espectro dado pelos parâmetros de aquisição e as formas das linhas dos picos. No entanto, melhora a resolução digital e definitivamente ajuda a uma caracterização mais adequada das formas dos picos do espectro.

3.4.3.4 Correção da forma da linha

Muitos algoritmos de quantificação de ressonância, como serão discutidos na seção 3.4.4, tentam aproximar o espectro de RM como a soma teórica de linhas com formatos lorentzianos e/ou gaussianos ou *voigts*. Infelizmente, as linhas de MRS *in vivo* não são geralmente bem comportadas devido a diversos fatores: correntes induzidas nas bobinas (também conhecida como correntes de Foucault, correntes parasitas ou ainda, *eddy currents*), não homogeneidade do campo magnético ou relaxação multi-exponencial ²¹. Neste tópico, enfatizaremos apenas as *eddy currents*, uma vez que a importância da homogeneidade de campo foi relatada na primeira seção do capítulo.

As sequências de pulso para MRS *in vivo*, seção 3.4.1, utilizam inúmeras vezes os gradientes de campo magnético, como, por exemplo, para auxiliar a localização do VOI, ou desfazer coerências, eliminando contribuições indesejadas, tal como na supressão da água (*spoiler gradient*). Os gradientes são, portanto, “ligados” e “desligados” numa frequência alta. Cada variação no campo magnético, pela lei de Faraday de indução eletromagnética, resulta

em uma corrente induzida no ambiente elétrico nas vizinhanças das bobinas (e consequentemente nas bobinas de gradientes). A distribuição e a dependência temporal da magnitude das correntes de Foucault dependem tanto do padrão de mudança dos gradientes quanto da geometria do condutor. No entanto, assim que termina a perturbação de campo, a magnitude da corrente induzida passa a reduzir-se em função do tempo, até se anular.

De acordo com a lei de Ampere cada corrente elétrica está associada a um campo magnético. Como resultado, as correntes parasitas produzem campos magnéticos adicionais que variam em função do tempo e que contribuem para os campos de gradientes utilizados para a seleção da fatia, interagindo, assim com o sinal detectado. É possível identificar as *eddy currents* através de alguns artefatos que demonstram a deterioração do perfil do VOI, como a alteração da amplitude do FID, variação da fase em função do tempo, além dos formatos das linhas se apresentarem distorcidos (tentativas de correções de fase simples não conseguem recuperar os formatos originais)⁴¹.

Enquanto a blindagem ativa dos gradientes e a utilização de pré-ênfase são soluções baseadas em hardware para reduzir os campos magnéticos variáveis no tempo, as correntes de Foucault residuais são geralmente inevitáveis. Um método simples e conveniente de correção pós-aquisição^{44; 45; 46} baseia-se no fato de que os campos magnéticos variáveis no tempo são os mesmos para todas as ressonâncias. Deste modo, adquire-se um sinal sem supressão da ressonância da água e quaisquer variações temporais da frequência do seu sinal no domínio do tempo podem ser atribuídas às correntes parasitas residuais. A modulação de fase encontrada é então aplicada, de forma oposta, ao espectro dos metabólitos (com supressão de água), desde que, é claro, este tenha sido adquirido com a mesma sequência. Assim, cancelam-se, automaticamente, as modulações de fase devido as correntes de Foucault residual. Nesta eliminação, a correção de fase de primeira ordem é feita de forma automática. Deve-se enfatizar que as correções de *eddy currents* precisam ser feitas independentemente de qual domínio será quantificado os dados.

3.4.3.5 Remoção do pico residual da água

Com os modernos aparelhos de RM, é possível suprimir a ressonância da água para valores no nível dos metabólitos. No entanto, nos casos em que o pico residual da água

deforma a linha de base, ou quando é necessário utilizar todo o intervalo espectral no algoritmo de ajuste, a linha residual da água deve ser removida.

A remoção do pico da água pode ser feita tanto no domínio do tempo quanto no domínio da frequência. Em ambos os domínios, uma alternativa é o uso de filtros. No domínio do tempo, a aplicação de um filtro de convolução passa-baixa para suprimir todas as componentes de alta frequência do espectro, geralmente, deixa apenas um pequeno resíduo do pico da água⁴⁷. Já se considerarmos o fato que a frequência de ressonância da água é diferente em relação a outros metabólitos, pode se utilizar filtros para remover as faixas de frequências específicas⁴⁸. Uma abordagem seria alterar o *chemical shift* da água para zero, então usar um filtro passa-baixa e subtraí-lo, posteriormente, a partir do sinal original. Outro procedimento seria aplicar um filtro passa-alta no FID, eliminando, assim, a água. Embora as técnicas citadas consigam bons resultados, uma filtragem imprópria pode influenciar os sinais reais dos metabólitos, afetando diretamente na acurácia da quantificação³¹.

Outra estratégia consiste em modelar o sinal no domínio do tempo como uma soma de várias senóides exponencialmente amortecidas associadas a uma decomposição em valores singulares (SVD)^{49; 50; 51; 52}. Como SVD requer pouca ou nenhuma entrada do usuário, ele é referido como um método "caixa-preta". Uma peculiaridade é que ele não permite a aplicação de parâmetros de conhecimento prévio, embora este fato seja uma vantagem por servir perfeitamente para a remoção automática de sinais⁵⁰. O sinal da água 'modelado', utilizando qualquer uma das técnicas baseadas neste modelo, é então subtraído do espectro de MRS, deixando apenas os sinais dos metabólitos de interesse⁵¹. A variante mais difundida na literatura baseada nestes procedimentos é algoritmo *Hankel Singular Value Decomposition* (HSVD)⁵². O método de estudo neste trabalho também emprega SVD e será exposto no capítulo 4.

3.4.3.6 Correção da linha de base

Os picos nos espectros *in vivo* geralmente não se encontram posicionados em uma linha reta horizontal de intensidade nula. Esta linha em que eles se “apoiam” é conhecida como linha de base, e sua correção ineficiente é uma das maiores fontes de variabilidade, e por consequência, erros na quantificação metabólica³¹.

A fonte mais comum de distorções na linha de base é a existência de compostos na amostra com T_2 muito curtos, como por exemplo, a presença de macromoléculas e lipídios. Estas substâncias são frequentemente responsáveis pela larga e disforme linha de base no MRS de ^1H do cérebro. Deve ser salientado que, uma forma de amenizar este tipo de contribuição é empregar TE longo. Em MRS de próton *in vivo*, um $TE > 80$ ms já reduziria a contribuição das macromoléculas no sinal, devido aos seus tempos de relaxação T_2 mais curtos (~ 30 ms), no entanto, isto seria feito à custa da perda das linhas de alguns metabólitos ²¹.

Outra possibilidade seria utilizar a diferença de relaxação T_1 entre os metabólitos e as macromoléculas ⁵³. Contudo, se eliminaria junto com a linha de base informações valiosas que as macromoléculas poderiam conter, uma vez que já se demonstrou que a linha de base apresenta padrões espectrais alterados em algumas doenças ^{54; 55}.

Em princípio, várias maneiras para remover a linha de base com processamento, na pós-aquisição, são possíveis. Uma abordagem comum é fazer o seu ajuste por polinômios ou por *splines* de diferentes ordens. Embora eficiente, a ambiguidade da seleção dos pontos de referência torna este método altamente subjetivo. Vários métodos automáticos já foram propostos, no entanto, um parâmetro de limiar tem que ser escolhido pelo usuário.

Uma técnica alternativa é a remoção do início do FID, que geralmente contém componentes de linhas largas. Para isto, um filtro de diferença aplicado com convolução pode ser usado. A simples eliminação de vários pontos iniciais do FID leva a ocorrência de artefatos que distorcem a linha de base, a menos que seja utilizado um tratamento de sinal especial, tal como a Predição Linear (PL). A principal desvantagem de ambas as abordagens é que não só os sinais de linha de base, mas todas as linhas de ressonância do FID serão influenciadas por este procedimento ⁴¹.

A maneira mais interessante e acurada de lidar com a linha de base é a incorporação dos seus sinais na função modelo utilizada para o ajuste do FID. Isto pode ser feito de duas formas. Se for possível identificar os parâmetros dos sinais que compõem a linha de base, podem ser adicionados à função modelo, como se fosse mais um metabólito a ser ajustado ⁵⁶, ou modelá-los como picos, geralmente gaussianas ⁵⁷. Um algoritmo de ajuste que utiliza essa abordagem é o LCModel, que será descrito no próximo tópico. Alternativamente, pode-se utilizar métodos que contabilizam as ressonâncias das macromoléculas e lipídios ao fazer uma decomposição do FID em uma lista de parâmetro, o que será discutido no capítulo posterior.

3.4.4 Processamento dos dados

A quantificação relativa, precisa e acurada de cada metabólito dos sinais de MRS é um passo essencial antes da conversão dos parâmetros estimados do sinal para quantidades bioquímicas (por exemplo, concentração e pH). Ela pode ser feita diretamente no domínio medido (a partir da estimativa da amplitude da componente do FID de cada linha de interesse), ou, alternativamente, no domínio de frequência (determinando a área de cada pico), após transformação do sinal em espectro pela DFT ou FFT. Por ser uma operação linear, os dois domínios são equivalentes, a princípio, e todos os parâmetros podem ser igualmente estimados em qualquer domínio ²¹. Contudo, devido às imperfeições experimentais ou aos custos computacionais, o processamento em um domínio pode ser mais acurado que no outro.

Há uma ampla gama de métodos na literatura capazes de quantificar os espectros *in vivo* e, por isto, o objetivo desta seção é compreender este contexto em que se insere o método de interesse deste estudo. Será abordado, inicialmente, as características e diferenças dos métodos que atuam no domínio da frequência e no domínio do tempo e, posteriormente, serão detalhados alguns dos algoritmos mais aplicados nas clínicas e nas pesquisas.

3.4.4.1 Métodos no domínio do tempo e frequência

A maioria dos algoritmos de quantificação pode ser classificada, de forma geral, pelo domínio de atuação: domínio do tempo, frequência ou misturando os dois. Em cada um destes grupos, eles ainda podem ser divididos como métodos iterativos ou ‘caixa-preta’.

No domínio da frequência, os procedimentos mais praticados para a quantificação podem ser subdivididos, essencialmente, em dois tipos: os que envolvem integração direta dos picos que compõem o espectro de RM (métodos não iterativos), e aqueles que utilizam bases conhecidas para obter os parâmetros das linhas do espectro obtido (métodos iterativos).

O procedimento mais antigo e ainda extensamente utilizado para a quantificação é o de integração das áreas sob os picos de interesse ^{58; 59}. A não necessidade de assumir hipóteses sobre o formato da linha, sendo possível quantificar qualquer formato, é a principal vantagem deste método. Já a desvantagem está relacionada, essencialmente, à baixa acurácia na

estimação. A exatidão dos métodos baseados na integração requer uma apropriada correção de fase, excelente correção da linha de base e supressão de água, além de ser crucial que os picos se encontrem bem definidos e separados. Em MRS *in vivo*, poucos são os picos nesta condição. Mesmo satisfazendo todas estas exigências, os picos têm grande probabilidade de serem subestimados (em até 40%)⁵⁸, uma vez que a cauda, em geral, é negligenciada, devido à dificuldade de definir os seus limites. Além disso, artefatos na aquisição, como a falta de dados no domínio de tempo, podem comprometer a quantificação⁶⁰.

Com a finalidade de amenizar o problema da subestimação e aumentar a acurácia, surgiram diferentes tipos de algoritmos, dentre eles, aqueles baseados em bases pré-determinadas para caracterizar o espectro obtido. Considerando os princípios físicos de formação do sinal (capítulo 2), um modelo possível seria a soma pura de linhas lorentzianas complexas. Mas, se contemplar também as inomogeneidades do campo, as imperfeições instrumentais e as distorções da linha de base, a função modelo (F_{calc}) precisaria englobar outras informações para se adequar melhor aos dados experimentais, como exemplificados a seguir:

$$F_{calc}(v, P) = \sum_{i=1}^m [w_L L_i(v) + w_G G_i(v)] + B_i(v), \quad (48)$$

onde L_i e G_i , denotam as funções lorentziana e gaussiana, respectivamente. B_i representa a contribuição da linha de base de cada linha, comumente representado por uma função polinomial. Já w_L e w_G , são fatores de ponderação que são usados para somar, com diferentes proporções, cada formato de linha (estes fatores podem ser estimados pelo algoritmo ou introduzidos pelo usuário, dependendo do *software* utilizado). Assume-se que v seja a frequência de cada ponto; m , o número de linhas usadas para o ajuste do espectro e P , uma lista de parâmetros (por exemplo: frequências, larguras de linhas, intensidades e fases). Outros tipos de funções (por exemplo, a *Voigt*) poderiam ter sido empregados também.

Vários métodos foram propostos baseados neste arquétipo^{61; 62; 63; 64; 65}. Um algoritmo bastante aplicado em pesquisa é o *Linear Combination of Model spectra* (LCModel)⁶⁵, que se utiliza apenas da parte absorptiva do espectro, idêntica a componente real do espectro após uma correção de fase eficiente. Esta ferramenta de análise espectral será mais bem descrita na próxima seção.

Para obter estimativas da lista P (frequências, larguras de linhas, intensidades e fases), várias técnicas de otimização local podem ser utilizadas para o ajuste do conjunto dos dados adquiridos. Elas geralmente tentam minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre os parâmetros da função modelo e os dados observados (problema dos mínimos quadrados não lineares). O algoritmo Levenberg–Marquardt ⁶⁶ é bastante empregado para este ajuste nos espectros ^{63; 65; 67}.

Embora haja vários métodos eficientes baseados em funções de ajuste iterativo no domínio da frequência ⁶⁸, há certas vantagens em realizá-los no domínio do tempo. É mais fácil, por exemplo, aplicar funções iterativas no domínio do tempo quando o sinal apresenta alguns problemas de amostragem, como amostragem não uniforme, ou ainda, a inexistência dos pontos iniciais do FID ou distorções na linha de base ⁶⁰. Por outro lado, algoritmos que atuam no domínio da frequência são preferencialmente empregados na análise espectral seletiva da frequência ⁶⁹, com a vantagem de reduzir o número de parâmetros do modelo ⁶⁸.

A função modelo dos métodos iterativos no domínio do tempo é composta por exponenciais complexas amortecidas e, a etapa de ajuste, é similar a anteriormente descrita, baseando-se frequentemente na otimização do problema dos mínimos quadrados não lineares. Há métodos que conseguem considerar, também, as imperfeições do campo estático, responsáveis por gerarem linhas gaussianas. Portanto, o modelo poderia ser ilustrado pela equação a seguir ⁶⁰:

$$y_n = \overline{y_n} + e_n$$

$$y_n = \sum_{k=1}^K a_k e^{i\theta_k} e^{(i2\pi f_k - \gamma_k - g_k t_n)t_n} + e_n \quad n = 0, 1, 2, \dots, N - 1 \quad (49)$$

onde K representa o número de linhas e $a_k e^{i\theta_k}$, a amplitude complexa (proporcional ao número de spins nucleares que contribui para aquela linha de ressonância na frequência f_k). Já γ_k representa a constante de amortecimento, θ_k , a fase de cada componente do sinal, g_k , a constante de amortecimento gaussiano, i , a unidade imaginária, e e_n representa um ruído circular complexo gaussiano branco. O termo circular significa que as partes reais e imaginárias do ruído não são correlacionadas e tem suas variâncias iguais.

Vários métodos de ajuste por modelo iterativo foram desenvolvidos para o domínio do tempo ^{70; 71; 72; 73; 74}. Dentre eles, o algoritmo *Advanced Method for Accurate, Robust and*

Efficient Spectral fitting (AMARES) ⁷¹ é um dos mais aplicados em pesquisas, e por esta razão, ele será discutido no próximo tópico.

A maioria dos algoritmos iterativos, em qualquer um dos dois domínios, permite a incorporação de restrições a partir de algum conhecimento prévio (*prior knowledge*) das características físicas do sinal. Estes dados podem ser obtidos a partir das propriedades dos spins dos metabólitos (tal como, constantes de acoplamento ²³) ou da relação entre as componentes espectrais, como, por exemplo, as razões entre as intensidades das linhas de multipletos, ou, também, as diferenças entre suas frequências e fases ⁶⁰. Outra forma de obter essas informações é a partir de espectros adquiridos de *phantoms* feitos com cada um dos metabólitos, medido sob as mesmas condições experimentais como serão feitos os experimentos *in vivo* ^{57; 75}. A fim de evitar a aquisição de espectros de *phantoms* para cada campo magnético e sequência de pulsos utilizados, simulações espectrais tem sido também usada ^{60; 63; 76}.

Entre outras razões, a utilização de *prior knowledge* é particularmente importante para que se consiga resolver picos sobrepostos de forma acurada ⁶⁰. Além disso, estas relações são traduzidas em limitações dos parâmetros espectrais, reduzindo, assim, o número de parâmetros a ser ajustado, que reflete no aumento da precisão da quantificação e redução do tempo de processamento computacional.

Muitos estudos têm demonstrado que a inclusão de *prior knowledge* para a análise bioquímica para os algoritmos iterativos é essencial para obter uma quantificação confiável, especialmente em caso de picos fortemente sobrepostos ^{62; 74; 77; 78; 79; 80}. Em resumo, a inclusão de *prior knowledge* é a forma principal para impor informações biofisicamente relevantes num algoritmo de ajuste espectral ²¹.

Operando no domínio do tempo, há também métodos denominados ‘caixa preta’ que se utilizam de princípios de predição linear e auto-regressão para modelar o FID, ou ainda, trabalham com o formalismo de espaço de estado. Algoritmos ‘caixas pretas’ bastante estudados são o *Linear Prediction Singular Value Decomposition* (LPSVD) e HSVD ^{81; 82}. LPSVD é baseado no princípio de PL e utiliza a decomposição SVD para estimar os coeficientes de predição no procedimento de PL expresso como uma matriz de mínimos quadrados. HSVD é baseado no espaço de estados, onde os dados são arranjados em uma matriz de Hankel. Ele calcula os autovalores da matriz de Hankel, que são estimativas das listas de parâmetros do sinal. Há inúmeros algoritmos variantes do HSVD, entre eles, o algoritmo *Hankel Lanczos Singular Value Decomposition* (HLSVD), que é uma versão computacionalmente mais eficiente, que calcula apenas uma parte do SVD usando o

algoritmo de bidiagonalização de Lanczos ³¹. Outro exemplo de método bastante eficaz e flexível é o KBDM, que será detalhado na seção 0.

Em resumo, as vantagens dos métodos ‘caixas pretas’ são o fato de que a interação do usuário é mínima (daí o nome do método), e todos os parâmetros são calculados em um único passo, sem a necessidade de valores iniciais ⁶⁰. Este é, naturalmente, um problema sério para espectros *in vivo*, uma vez que a capacidade de inserir *prior knowledge* pode ser crucial para a obtenção de resultados confiáveis e consistentes, sendo, portanto, menos adequados para sinais mais complicados, como espectros *in vivo* de TE curto ⁸². Além disso, alguns destes métodos estão limitados à apenas linhas lorentzianas, o que pode ser bastante limitante para modelar a linha de base. Formas de linhas gaussianas são geralmente preferidas para modelar sinais cujas linhas são largas ⁸².

Outra característica destes métodos é que, em geral, eles fornecem um bom ajuste matemático para os dados, mas, particularmente quando o sinal apresenta baixa SNR, os parâmetros determinados por estes métodos podem não ter significados físicos ⁶⁰. Eles são, porém, capazes de representar linhas de forma não lorentzianas por uma superposição de várias lorentzianas ⁶⁰. Esse fato pode ser explorado para remover componentes indesejáveis presentes no sinal (ver seção 3.4.3.5, que descreve os métodos para supressão do pico residual da água).

A precisão dos resultados do ajuste depende da correspondência correta entre o modelo e as características selecionadas dos sinais experimentais. Alguns estudos e artigos de revisão ^{60; 68; 82} já fizeram análises comparativas mais aprofundadas dos diferentes algoritmos e abordagens de processamento de sinal, explorando as vantagens e desvantagens de cada um. Além disso, outras técnicas de quantificação, que aqui não se adequam as classificações mencionadas, como análise por redes neurais ou componentes principais ^{82; 83; 84; 85}, também foram avaliadas e podem ser encontradas na literatura.

3.4.4.2 Algoritmos de ajuste espectral

Nas últimas duas décadas, o processamento de sinal de MRS *in vivo* avançou de uma simples integração a algoritmos avançados que incorporam *prior knowledge* ou conjunto de bases metabólicas. Os algoritmos de ajuste mais difundidos aparecem no software jMRUI ⁸⁶;

⁸⁷, como o AMARES ⁷¹, e no software LCModel ^{62; 65}, com o algoritmo de mesmo nome, entre outros ⁸⁸. Ao invés de discutir todos os algoritmos de ajuste disponíveis, já que os princípios deles já foram introduzidos no tópico anterior, aqui, apenas abordaremos alguns dos métodos mais utilizados: AMARES e LCModel.

3.4.4.2.1 AMARES

O primeiro método iterativo no domínio do tempo e disponível para quantificação de dados de MRS foi VARPRO (*Variable Projection*) ⁷⁴. O AMARES foi desenvolvido posteriormente, de forma a aprimorar VARPRO, utilizando um algoritmo de otimização mais sofisticado para o ajuste iterativo de mínimos quadrados não lineares, resultando em estimativas mais acuradas de máxima verossimilhança dos parâmetros. Ademais, o método inclui uma maior variedade dos tipos de conhecimento a priori no processamento (como identificar o tipo de sinal – FID ou eco), disponibiliza a escolha das formas lorentizana ou gaussiana para cada pico além de também possibilitar ao usuário determinar os limites inferiores e superiores de cada um dos parâmetros ⁶⁰. Isso resulta em uma maior precisão, flexibilidade e robustez do método.

Embora o AMARES venha sendo aplicado com bastante êxito para experimentos de MRS *in vivo* de TE curto ⁸⁹, a dificuldade de ajuste quando há sobreposições de picos e a necessidade de uma interação do usuário mais intensa tendem a encorajar os métodos baseados no uso de perfis de metabólitos. Estes métodos agregam mais informações de forma implícita no modelo, em especial, aquelas relacionadas com as condições experimentais de aquisição ⁸².

O algoritmo do AMARES pode ser encontrado no software livre para análise de dados de MRS *in vivo* jMRUI ⁸⁶. Além de possuir ferramentas para pré-processamento, ele prevê uma série de métodos de quantificação, como os iterativos: AMARES, *quantitation based on QUantum ESTimation* (QUEST) ⁷³, *Accurate Quantitation of Short Echo time domain Signals* (AQSES) ⁷⁰; e os métodos ‘caixas pretas’: HSVD, HLSVD, *Hankel Total Least Squares* (HTLS), *Hankel Lanczos Total Least Squares* (HLTLS), *Linear Predictive Singular Value Decomposition* (LPSVD) ³¹.

3.4.4.2.2 LCMModel

O algoritmo LCMModel ajusta o espectro adquirido de MRS ^1H como uma combinação linear dos sinais de RM dos compostos puros ou isolados. Uma vez que os sinais da solução modelo são medidos com a mesma sequência de pulsos utilizada *in vivo*, muitas das características espectrais, tais como acoplamentos J, *chemical shifts*, distorções espectrais e erros de localização, são similares.

Os espectros adquiridos individualmente dos metabólitos corresponderão aos elementos de uma base metabólica. É importante que ela esteja completa, ou seja, todos os metabólitos que estão presentes nos espectros *in vivo* devem pertencer a base utilizada. Quando um componente (espectro metabólico) é omitido do conjunto, o processamento provavelmente resultará em um desvio sistemático nos parâmetros estimados e, em particular, nas amplitudes dos outros metabólitos⁹⁰. Isto se deve ao fato que as amplitudes dos metabólitos normalmente estão correlacionadas e em função da quantidade de sobreposição espectral. A inclusão de bases de metabólitos que não estão presentes na amostra a ser medida normalmente não induz a erro, pois a amplitude de qualquer metabólito inexistente pode ser simplesmente definida como zero. No entanto, a inclusão de base inexistente na amostra tomará mais tempo de cálculo e terá uma convergência mais lenta²¹.

Em MRS de próton *in vivo*, com TE curto, infelizmente, os espectros são tipicamente caracterizados por uma base macromolecular significativa somada a uma combinação linear dos sinais dos metabólitos. Com o propósito de alcançar uma quantificação espectral significativa, as ressonâncias macromoleculares têm que ser levadas em conta. No artigo que popularizou o uso do LCMModel⁶⁵, a linha de base foi aproximada por uma função *spline* cúbica. No entanto, este procedimento, como discutido na seção 3.4.3, não garante os melhores resultados.

Atualmente, o algoritmo está agregado a um software completamente automático, comercial, com o mesmo nome do método⁹¹, sendo bastante empregado em pesquisa por exigir uma única entrada pelo usuário: os dados no domínio do tempo. Obviamente, é necessário que uma configuração inicial seja feita de maneira a definir o conjunto de metabólitos que constituirão a base a ser aplicada, podendo ser inserido pelo usuário ou utilizar um dos que se encontram disponíveis na ferramenta³¹.

4 KBDM

4.1 Problema da Inversão Harmônica

Diagonalização Filtrada foi o nome dado por Neuhauser ⁹², em 1990, a um procedimento numérico concebido para a diagonalização de grandes matrizes esparsas em cálculos de dinâmica quântica. O método foi aprimorado em 1995 ⁹³ para ser aplicado à análise espectral em alta resolução de um sinal temporal relativamente curto e contínuo. O método foi chamado, então, Método da Diagonalização Filtrada e tornou-se uma ferramenta alternativa para o processamento de dados adquiridos por RM.

A eficiência do formalismo vem sendo substancialmente aprimorada, ^{3-4,94-95}. O método possui diversas aplicações em física e química, entre elas, em MRS, é usado para analisar sinais no domínio do tempo através da resolução do problema da inversão harmônica (HIP, *Harmonic Inversion Problem*). Simplificadamente, este problema se resume em ajustar um sinal $c(t)$ por uma soma de funções harmônicas complexas, amortecidas exponencialmente, definida em uma grade de tempo equidistante:

$$\begin{aligned}
 c(t_n) &= \sum_{k=1}^K d_k [\cos(\omega_k t_n + \theta_k) + i \operatorname{sen}(\omega_k t_n + \theta_k)] e^{-\gamma_k t_n} \\
 &= \sum_{k=1}^K |d_k| e^{i\theta_k} e^{i2\pi f_k n\tau} e^{-\gamma_k n\tau} \quad \text{ou} \\
 &= \sum_{k=1}^K |d_k| e^{i\Omega_k t_n}, \quad t_n = n\tau \quad n = 0, 1, 2, \dots, N-1
 \end{aligned} \tag{50}$$

sendo que $d_k = |d_k| e^{i\theta_k}$ corresponde à amplitude; γ_k , a constante de amortecimento; $\Omega_k = i\gamma_k + 2\pi f_k$, a frequências complexa e θ_k , a fase, de cada componente do sinal. Além disso, τ é o intervalo de tempo de amostragem e i , a unidade imaginária. Frequentemente é conveniente (embora não necessário) assumir que todas as constantes de amortecimento têm sinal positivo. A lista $\{\Omega_k, d_k\}$ corresponde à representação paramétrica do sinal temporal, com cada par (Ω_k, d_k) definindo um pico.

O método que soluciona o HIP tem que ser capaz de extrair as $4K$ indeterminações (K frequências f_k , $+K$ amplitudes $|d_k|$ $+K$ fases θ_k $+K$ constantes do amortecimento γ_k). Do ponto de vista da informação, para que isto ocorra, o número de pontos da amostragem, $2N$ (N pontos reais $+N$ pontos imaginários), tem que ser no mínimo igual ao número de incógnitas, portanto, $2N \geq 4K$ ou $N \geq 2K$. Geralmente, o número de componentes harmônicas necessárias para modelar um sinal no domínio no tempo, K , também é desconhecido e deve ser determinado pelo próprio método.

4.2 KBDM: Solução simples para a HIP

Obter as variáveis desconhecidas, d_k e Ω_k , é um processo algébrico simples se escolhermos um conjunto de base adequado. Para simplificar e tornar mais fácil a compreensão do método, realçaremos apenas os principais pontos, uma vez que ele está bem descrito em ¹.

A base de Krylov é utilizada, frequentemente, em algoritmos modernos e iterativos para encontrar alguns autovalores de grandes matrizes esparsas ou resolver grandes sistemas de equações lineares. Como exemplo, há o Método de Diagonalização na Base de Krylov, nomeado por ¹, cujo objetivo é solucionar a HIP, como está descrito na equação (50). O formalismo é descrito por uma matriz $U_p \in \mathbb{C}^{M \times M}$, definida no espaço de Krylov ($\mathcal{K}$), com $p=0$ ou 1 , cujos elementos $[U_p]_{mn}$ são definidos em função do sinal $\{c_n\}$:

$$[U_p]_{mn} = c_{n+m+p}, \quad (51)$$

onde $n, m = 0, 1, 2, \dots, M-1$, o que implica na aquisição dos pontos $c_n = p, p+1, p+2, \dots, p+2M-2$, para descrever a matriz U_p . Portanto, para $p=0$ e $p=1$, é preciso pelo menos $2M$ pontos, ou seja, $N \geq 2M$ ou $M \leq N/2$.

A partir de U_p é possível formar um problema de autovalores generalizado, PAG, onde $\{\mu_k\}$ são seus autovalores e $\{B_k\}$, seus autovetores:

$$U_1 B_k = \mu_k U_0 B_k \quad (52)$$

Os autovetores devem ser ortonormalizados com respeito a U_0 :

$$B_k^T U_0 B_{k'} = \delta_{kk'} \quad (53)$$

Deste modo, a lista de parâmetros $\{\Omega_k, d_k\}$ é calculada pelas expressões:

$$\mu_k = e^{-i\tau\Omega_k} \quad (54)$$

$$d_k^{1/2} = B_K^T C, \quad (55)$$

onde T sobrescrito simboliza que a matriz é transposta e $C = (c_0, c_1, c_2, \dots, c_{M-1})^T$ é definido como um vetor coluna de dimensão $M \times 1$.

Portanto a solução do PAG possibilita a determinação de d_k e Ω_k . Há várias formas bem estabelecida na literatura de resolver-se problema do autovalor generalizado, como por exemplo, *EigenValue Decomposition* e *canonical orthogonalization* (EVD), pelo método QZ ou *Singular Value Decomposition* (SVD)⁹⁶. A partir da solução da PAG, com qualquer um destes métodos, é possível determinar μ , uma matriz diagonal com os autovalores μ_k e B_k . Pela equação (54), pode se determinar a frequência Ω_k e, d_k , através da equação (55).

A princípio, não se conhece o número total de linhas, K , mas isto não é um problema desde que N tenha o tamanho suficiente para que $N/2 \geq M \geq K$.

Para $N < 2K$, a lista de parâmetros será dependente do tamanho do sinal, mas para sinais sem ruídos e $N \geq 2K$ ou $M \geq K$, as matrizes U_0 e U_1 terão $M-K$ autovalores nulos, e a lista de linhas será definida pelos K autovalores não nulos restantes⁹⁷.

Em sistemas físicos reais, onde há presença de ruído, conseqüentemente, as matrizes U_0 e U_1 tornam-se mal condicionadas (*ill-conditioned*), ou, em outras palavras, a singularidade das matrizes é efetivamente removida. A presença de ruído requer $M > K$, e as $(M-K)$ componentes das listas, com pequenos d_k , tentarão descrever o ruído e as discrepâncias do formato dos picos, se houver. Na constituição dos sinais reais, frequentemente, há uma densa composição espectral relacionada ao ruído, que requer um número significativamente maior de amostragens para se atingir altas resoluções. Isto significa que os dados ruidosos exigirão sinais mais longos para atingir a mesma resolução. Mas vale ressaltar que, uma alta relação sinal-ruído pode ser convertida automaticamente em alta resolução.

Entretanto, sinais longos impõem custos computacionais impraticáveis, uma vez que o processamento de matrizes grandes leva a problemas numéricos (*roundoff* e *overflow*) e de memória, além dos cálculos serem da ordem de N^3 ⁹⁷. Isto limita o uso do KBDM para apenas sinais curtos (ordem de apenas alguns milhares de pontos).

Para evitar esses problemas operacionais com sinais muito longos, pode-se fitar o FID dividindo a análise espectral em várias pequenas janelas, por meio de um filtro de Fourier aplicado às funções de base de Krylov. Este modelo foi chamado de FDM.⁹⁵

O FDM consiste, inicialmente, na aplicação de um filtro de Fourier às funções de Krylov, que fragmentará a matriz em pequenos blocos diagonais (procedimento conhecido como filtragem). Sucessivamente, na etapa conhecida como diagonalização, explora-se a natureza harmônica dos dados, com a diagonalização dos blocos através de operações de Álgebra Linear⁹⁷.

Portanto, um aspecto importante do FDM, é que as submatrizes modelam sinais dentro de um intervalo de frequência especificado. Em vez de calcular todo o espectro de uma só vez, como fazem os outros métodos, estimam somente as características dentro de uma pequena região espectral. Como resultado, a característica essencial do método é fazer a diagonalização das matrizes muito mais rapidamente, pois permite que esta seja realizada dentro de pequenas submatrizes centradas ao longo da diagonal. Como o tamanho dessas submatrizes é reduzido (menos de 100, na prática), a complexidade computacional do FDM é quase linear e numericamente estável.

No âmbito da FDM, a resolução não está limitada pela relação da incerteza da DFT. De fato, boa qualidade de sinal (o que significa relação sinal-ruído alta e linhas com perfeitas formas Lorentzianas) é efetivamente convertida em resolução.

Isto significa que, desde que o sinal satisfaça o modelo da equação (50), o FDM pode prover uma resolução muito além do Relação da Incerteza Tempo-Frequência da FT.

Obviamente esta observação não implica que os resultados serão independentes do tamanho N do sinal. As relações entre M , K e N , e suas consequências, a partir de sinais sem ruídos e ruidosos, descritas para o KBDM, também se aplica aqui. Para descrições mais detalhadas e uma revisão do algoritmo do FDM para problemas unidimensionais e multidimensionais no artigo de revisão¹.

Para este trabalho, optou-se pelo KBDM em detrimento do FDM, pelo fato de que tanto os FIDs simulados quanto os adquiridos *in vitro* serem compostos por números de pontos reduzidos (<4096). Desta forma, o custo computacional não é um limitante e o KBDM, ao contrário do FDM, praticamente não possui parâmetros iniciais a serem definidos

pelo usuário, tal como a FT, minimizando, assim o surgimento de problemas com interferências geradas pelo usuário.

Uma vez que a lista de parâmetros é calculada, o próximo passo, dos algoritmos de KBDM ou de FDM, consiste em uma interpretação cuidadosa e inteligente da lista de parâmetros, a fim de separar o que é "lixo" (ou ruído) do que é informação verdadeira. Nesta fase, a interferência humana (tanto do programador quanto do usuário) pode influenciar o espectro final. Esta pode ser uma desvantagem do método ou, como em muitos casos, uma vantagem, por exemplo, a manipulação da lista de parâmetros permite selecionarem-se as informações contidas no sinal de entrada. Este privilégio tem sido usado com sucesso para remover interferências indesejáveis, por exemplo, picos espúrios ou picos que sofrem *overlap* com outros de interesse.

Estudos iniciais feitos em São Carlos comprovaram o potencial da técnica, para a aplicação do formalismo do KBDM na técnica de sequência de Precessão Livre no Estado Estacionário (SSFP, *Steady State Free Precession*) no decorrer da dissertação⁹⁷. A pesquisa⁹⁷ validou o potencial do método de diagonalização para a técnica SSFP. Portanto, dando prosseguimento ao trabalho citado, este estudo tem por finalidade validar o método de Diagonalização, neste caso o KBDM, para estudos de MRS de prótons *in vivo* resolvidos no tempo.

4.3 Construindo o Espectro

Uma vez que o conjunto de parâmetros $\{d_k, f_k, \gamma_k, \theta_k\}$, ou, na forma complexa $\{\Omega_k, d_k\}$, foi obtido através do KBDM ou do FDM, pode-se facilmente construir a representação espectral $S(\omega)$ correspondente ao sinal no domínio do tempo, a partir da integral analítica de Fourier da equação (50) para $c(t)$:

$$S(\omega) = \int_0^\infty c(t) e^{i\omega t} dt = \sum_{k=1}^M d_k \int_0^\infty e^{it(\omega - \Omega_k)} dt = \sum_{k=1}^M \frac{d_k}{i(\omega - \Omega_k)} \quad (56)$$

Pode ser representado também em função da frequência φ em Hertz:

$$S(\varphi) = \sum_{k=1}^M \frac{|d_k| e^{it\theta_k}}{\gamma_k + 2\pi i(\varphi - f_k)} \quad (57)$$

5 PROCESSAMENTO DE SINAIS DE MRS DE ^1H PELO KBDM

Neste capítulo aprofundaremos mais na avaliação da eficácia, e respectivas vantagens, do KBDM quando comparado com os métodos tradicionais de processamento de espectros por RM que, geralmente, são baseados no formalismo de Fourier. Dentre estes benefícios, que serão mais bem discutidos nos tópicos deste capítulo, podemos mencionar a eliminação eficiente de linhas que atrapalham a quantificação, como o pico residual da água, ou mesmo, o seu pico sem supressão. Além disso, a técnica se apresenta como possível candidata no que se refere à análise quantitativa dos metabólitos. Para demonstrar as aplicações citadas, bem como a eficácia do método, trabalhamos com sinais simulados e FIDs adquiridos de um sistema de 2 Teslas, para animais, e de 3 Teslas, para humanos. Para a obtenção dos dados experimentais, utilizamos *phantoms*, que foram construídos especialmente para o presente projeto, com soluções dos principais metabólitos cerebrais.

É importante notar que todos os processamentos espectrais feitos por KBDM e FT neste trabalho, foram realizadas através do *plug-in* implementado em linguagem C e Fortran, no ambiente Code Builder do Origin 8.5.1 (OriginLab, Wellesley Hills, Massachusetts, EUA) ⁹⁶⁻⁹⁷.

As metodologias, os resultados e as discussões dos experimentos realizados foram organizados sob os subtítulos de Simulações Espectrais e Análises Experimentais. E o embasamento teórico da aplicação do KBDM para a quantificação espectral está no primeiro tópico deste capítulo.

5.1 Quantificação por KBDM

Vários métodos de processamento de sinais no domínio no tempo baseados na decomposição em valores singulares foram desenvolvidos ⁶⁰ e utilizados principalmente para extrair o sinal da água, vide seções 3.4.3.5 e 3.4.4.1. No entanto, os métodos baseados em SVD geralmente não são adequados para quantificar os metabólitos devido a várias limitações. A principal delas é que o número ideal de ressonâncias a serem ajustadas precisam ser determinadas com antecedência para toda a faixa espectral, o que limita a aplicação e

impõe uma demanda por usuários com alto nível de conhecimento para a realização do processamento. Outro método baseado em SVD e que não apresenta a limitação apresentada é o KBDM, e que apesar do seu desenvolvimento teórico ser facilmente encontrado na literatura, a sua aplicação para a quantificação de dados ainda não havia sido explorada, ou mesmo, elaborada. Assim, proporemos, nas próximas seções, o uso do KBDM para uma quantificação automática, na qual a informação de entrada se restringe a definição da faixa de frequência e FWHM na qual se encontram os picos de interesse.

Como visto pelas equações (33) e (50), o sinal é, em uma visão simplificada, uma oscilação amortecida. Da tabela de transformadas de Fourier, sabe-se que o sinal de cada pico no domínio do tempo, $s_k(t)$, tem uma correspondência no domínio da frequência, $S_k(f)$, dada por:

$$s_k(t) = d_k e^{2\pi f_k t} e^{-\gamma t} u(t) \xrightarrow{FT} S_k(f) = \frac{d_k}{\gamma + 2\pi(f - f_k) i} , \quad (58)$$

sendo $u(t)$ a função degrau e d_k a amplitude complexa, $|d_k|e^{\theta_k i}$, do FID. Se manipularmos esta equação de forma a tornar real o denominador de $S_k(f)$, obteremos:

$$S_k(f) = \frac{\gamma d_k}{\gamma^2 + 4\pi^2(f - f_k)^2} - \frac{2\pi(f - f_k)d_k}{\gamma^2 + 4\pi^2(f - f_k)^2} i \quad (59)$$

Quando o pico não apresenta defasagem ($\theta = 0$), d_k é real, e, portanto, $d_k = |d_k|$, o que implica que a parte real de $S_k(f)$ é o modo absorptivo do espectro e a parte imaginária, o modo dispersivo. E quando isto ocorre, a parte real corresponde à descrição de uma função lorentziana (conhecida também como função de distribuição de probabilidade de Cauchy) escalonada por $d_k/2$, que, conseqüentemente, é também o valor da sua área. Em outras palavras, se um sinal a ser processado por KBDM, ajusta um pico que se deseja quantificar por apenas uma lorentziana de fase nula, pode-se determinar sua área simplesmente calculando a metade do módulo da amplitude do FID, $|d_k|/2$.

Como já foi mencionado na seção 3.4.2, a integral do espectro $S(f)$ composto por N linhas ($S(f) = \sum_{k=1}^N S_k$), seria igual a integral do modo absorptivo, uma vez que a integral do modo dispersivo de cada pico é nula. Logo, a expressão matemática seria:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} S(f) df = \sum_{k=1}^N \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\gamma d_k}{\gamma^2 + 4\pi^2(f - f_k)^2} df = \sum_{k=1}^N \frac{d_k}{2} \quad (60)$$

Deste modo, é possível determinar a área embaixo de toda a curva do espectro utilizando todas as lorentzianas dadas pelo KBDM. Além disso, é possível também calcular a área de picos independentes, ao gerar um espectro auxiliar formado apenas pelas linhas que ajustam estes picos. Para selecionar estas lorentzianas, usa-se algum critério (por exemplo, intervalos de frequência) sobre a lista de parâmetros resultante do processamento do KBDM do FID original.

Frequentemente, as linhas dos espectros experimentais não possuem formatos de lorentzianas perfeitas, devido a diversos fatores, como, por exemplo, a influência das correntes induzidas. Então, alguns de seus picos podem eventualmente ser ajustados por mais de uma lorentziana. E mesmo que se faça a correção de fase do sinal antes do processamento, estas lorentzianas podem apresentar defasagens diferentes entre si, isto é, a parte real e a parte imaginária de cada uma pode ser composta por um modo dispersivo e absorptivo, como foi retratado na equação (40). Logo, se rearranjarmos a equação (59) em uma parte real e uma parte imaginária, uma vez que d_k é complexo, e integrarmos, o elemento dispersivo das partes real e imaginária continuará resultando em zero. Isto implica que a integral do espectro é apenas a integral das componentes absorptivas (real e imaginária).

À vista disso, pode se utilizar também a equação (60) para o cálculo da área de um pico independente, composto por algumas componentes S_k - apenas aquelas que estão dentro da faixa de frequência e de FWHM que está o pico de interesse. Portanto, se refizermos os cálculos da equação (60), agora para d_k complexo, e considerando que K lorentzianas ajustam a linha que gostaríamos de quantificar, teremos:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} S(f) df = \sum_{k=1}^K \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\gamma |d_k| e^{\theta_k i}}{\gamma^2 + 4\pi^2(f - f_k)^2} df = \sum_{k=1}^K \frac{|d_k| e^{\theta_k i}}{2} \quad (61)$$

É importante ressaltar que estamos considerando aqui que o espectro precisa apenas de correção de fase de ordem zero, ou seja, os θ_k são independentes da frequência, e que a correção foi feita previamente à quantificação do KBDM. Assim, concluímos que é possível quantificar cada pico, mesmo quando ajustados por mais de uma lorentziana, apenas conhecendo as suas amplitudes e fases.

5.2 Simulações Espectrais

Para estudarmos melhor o comportamento do método em situações em que conhecemos todos os parâmetros, fizemos simulações dos principais picos dos metabólitos cerebrais no Origin 8.5.1. Reproduzimos espectros similares aos gerados por um campo magnético estático de 3,0 Tesla (frequência de transmissão de 128 MHz), banda espectral constante e igual a 2 kHz, com 2048 pontos amostrados por experimento. Para que as simulações pudessem exemplificar as relações de dados *in vivo*, as amplitudes dos picos, *chemical shifts*, larguras à meia altura (FWHMs, *Full Widths at Half Maximum*), e as constantes T_2 foram extraídas de um espectro clínico de um paciente saudável, obtido em um campo de 3.0 T, como pode ser conferido na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros dos principais picos dos metabólitos cerebrais e também de picos não desejados, mas que frequentemente aparecem em espectros *in vivo* (como lipídios, por exemplo) de um espectro clínico de humanos obtido em um campo de 3T.

Metabólitos	Amplitude do Pico (u. a.)	Chemical Shift (ppm)	FWHM (Hz)	$1/T_2$ (s ⁻¹)
Pico1	6,896E-3	0,591	117,329	368,6
Pico2	8,006E-4	1,256	22,982	72,20
GABA	2,015E-3	1,934	15,9792	50,20
NAA	2,955E-3	2,005	4,32902	13,60
NAAG	2,0E-4	2,110	47,8738	150,4
Glx2	1,271E-4	2,115	3,50141	11,00
GABA2	3,106E-4	2,279	3,81972	12,00
Glu	2,944E-4	2,354	2,73747	8,60
Cr	1,396E-3	3,035	3,43775	10,80
Cho	5,359E-4	3,219	2,80113	8,80
M-Ins3	1,391E-4	3,256	3,02395	9,50
M-Ins	2,833E-4	3,571	2,16451	6,80
M-Ins2	1,035E-4	3,645	1,4324	4,50
Glx	7,264E-4	3,785	6,97099	21,90
Cr2	2,061E-3	3,950	7,95775	25,00
Cho+M-Ins	5,68E-3	4,122	36,1919	113,7

Com os parâmetros da tabela 2 de cada pico, e considerando que cada um deles é formado por uma única linha lorentziana de fase inicial zero, geramos os FIDs como funções exponenciais similares à equação (33).

A partir dos FIDs, foi possível aplicar o formalismo da FT e do KBDM. A figura 20 ilustra um espectro gerado por esses dados. A robustez e o potencial do KBDM foram avaliados através do processamento de dados com vários tipos de truncamentos, com

acréscimo de diferentes níveis de ruídos e através das quantificações dos metabólitos pela técnica.

Figura 20 – Espectro gerado a partir de todos os parâmetros da tabela 2, com auxílio do método KBDM para a construção espectral. Apenas o NAAG não foi identificado devido à dificuldade de fazê-lo visualmente, por ele está sob o NAA.

Inicialmente avaliamos a eficiência do formalismo do KBDM para truncamentos decrescentes do FID simulado sem ruído, até observar o limite que não se perdia nenhuma informação em relação às linhas, em que ele ainda conseguia encontrar os parâmetros dos 16 picos previamente simulados, vide figura 21. Pela observação do espectro, constatamos que processando até os 80 primeiros pontos do FID, o espectro gerado é equivalente ao reproduzido com todos os pontos, já com 64 pontos, o método não consegue definir três dos picos menores.

Figura 21 – Espectros de diferentes truncamentos do dado simulado. (a) FID com marcações indicando onde foram feitos os truncamentos do número de pontos para os diferentes processamentos utilizando o KBDM. (b) Espectros feitos a partir de truncamentos decrescentes do mesmo FID. Para referência, foi incluído o espectro obtido utilizando o formalismo de Fourier aplicado ao sinal completo. Foi feito truncamento até a perda de informação (64 pontos).

Como se pode observar, mesmo quando é utilizado um número restrito de pontos (64 pontos, por exemplo), o KBDM ainda é efetivo no que se refere à definição dos picos principais do espectro. Esse número obtido ainda é ligeiramente maior do que o previsto na teoria, que apenas 32 pontos seriam necessários para definição de todos os picos de nosso

sinal (tópico 4.2). Entretanto, como procedimento de ajuste, a solução do KBDM produz, em geral, uma lista de parâmetros que representa não somente os picos genuínos, mas também os picos espúrios. Os picos genuínos são mais estáveis, enquanto os picos espúrios usualmente variam com o redimensionamento da matriz (truncamento dos dados). A lista poderá conter picos espúrios mesmo quando o ruído presente no sinal em análise é desprezível ou nulo, neste caso. Portanto, no caso do processamento de 64 pontos iniciais, por mais que ele encontre 32 picos, apenas 13 picos são genuínos. Os demais apresentam valores de amplitudes insignificantes, impossíveis de se identificar visualmente, podendo ser filtrados facilmente, por um filtro passa-alta.

A partir do truncamento mínimo dos primeiros 80 pontos do FID, a técnica conseguiu determinar todos os picos genuínos, além de apresentar todos os espectros estáveis e equivalentes entre si e em relação, também, ao espectro obtido, através da FT e do KBDM, utilizando o número total de pontos, figura 21(b). Isto demonstra a grande capacidade do KBDM em processar sinais truncados, uma vez que este conseguiu processar, sem perda de resolução espectral, até 4% do tamanho original do FID (os 80 primeiros pontos). Esta proporção em relação ao tamanho do FID original, e de todos os truncamentos processados, estão indicadas na figura 21(b).

Já a figura 22, permite comparar o KBDM e a FT no processamento de dados com um truncamento significativo, neste caso, aproximadamente 4% do tamanho original. Utilizou-se o FID da figura 21(a) truncado nos primeiros 80 pontos iniciais. Observa-se que com o ajuste do KBDM não houve perda de resolução (espectro azul), enquanto com a FT é impossível resolver a maioria dos picos (espectro de cor preta) devido à relação de incerteza. Os artefatos, tal como as oscilações de Gibbs, são também outra consequência de processar dados truncados com a FT, como foi abordado no tópico 3.4.2, e são melhor visualizados no espectro vermelho. Isto ocorre porque o final do FID deste espectro foi preenchido por zeros, antes do processamento, o que possibilitou melhorar a interpolação do espectro e, consequentemente, visualizar melhor as oscilações de Gibbs que possuem uma frequência alta (discussão feita na seção 3.4.3.3). O espectro vermelho da figura 22 teve seu FID completado com 1968 zeros, possuindo um tamanho final de 2048 pontos, para obter a mesma resolução digital que o FID de 2048 pontos. É importante ressaltar que a resolução digital é diferente que a espectral, pois não acrescenta nenhuma informação que não tenha sido adquirida durante a amostragem, apenas apresenta melhor as informações já medidas.

Já o espectro azul, demonstra a vantagem de aplicar o KBDM quando se deseja ajustar dados truncados. Para um espectro sem ruído, trabalhando com apenas 4% dos dados, a

técnica ajusta todos os picos, até mesmo aqueles que geralmente são difíceis de resolver, tais como NAAG, Glu+Gln e GABA2 (em relação ao pico do NAA, eles tem amplitudes na ordem de apenas 5%, e encontram-se sobrepostos à sua cauda).

Figura 22 – Comparação entre a FT e o KBDM para um FID simulado com truncamento nos 80 pontos iniciais, em FID de tamanho original de 2048 pontos. Para melhor avaliar a baixa resolução e artefatos, como as oscilações de Gibbs, foi também retratada a FT de um FID com preenchimento de zeros, resultando em 2048 pontos (1968 zeros no final). O preenchimento possibilita uma melhor interpolação do espectro e, conseqüentemente, melhor definição dos picos e artefatos gerados pelo truncamento.

Outro estudo feito foi relacionado à aplicação do KBDM na quantificação dos metabólitos. Ao ajustar o FID, o método gera uma lista de parâmetros que contém dados de todos os picos genuínos e espúrios. Com alguns filtros simples, que filtrem as propriedades que definam o pico que desejamos quantificar, é possível selecionar apenas a(s) lorentziana(s) que o ajustam. Por exemplo, pode-se buscar por amplitudes que sejam igual, maior, ou menor que um valor, ou, ainda, que a frequência e o FWHM da lorentziana de interesse estejam dentro de um intervalo. E conhecendo a(s) amplitude(s) dos FID(s) desta(s) lorentziana(s) e sua(s) fase(s), pode-se determinar a área do pico ajustado, como foi discutido na seção anterior.

A figura 23 apresenta todas as amplitudes dos picos encontrados após o ajuste feito pelo KBDM dos 1000 primeiros pontos do FID da simulação retratada na figura 20. Deve-se ressaltar, que as escolhas do tamanho do FID a ser utilizado é feita através da sua observação cuidadosa, figura 21(a). Busca-se manter todas as informações relativas aos metabólitos, eliminando apenas regiões do sinal que a relação sinal ruído está abaixo de um. E por isto, foi escolhido truncar em 1000 pontos, que está na região limite que $SNR \approx 1$. Isto resulta em um processamento mais rápido, eficiente, e, quando o sinal apresenta-se ruidoso, em uma filtragem de frequências passa-baixa (como será visto na próxima seção).

É possível concluir, então, que os 500 picos encontrados como solução pelo KBDM, há apenas 16 picos que tem valores significativos e, que na verdade, correspondem aos picos simulados. Os demais picos encontrados possuem amplitudes extremamente baixas, da ordem de 10^{-19} , e, desta forma, podem ser descartados. Para quantificar estes picos, poderíamos selecioná-los individualmente e calcular manualmente, ou programar uma busca, pela lista, de propriedades que conhecemos a priori sobre eles. De fato, as propriedades das linhas dos metabólitos cerebrais são bem conhecidas²³ e já são utilizadas para melhorar a precisão das quantificações⁷¹.

Figura 23 – Para um espectro sem ruído, truncado em 1000 pontos, o KBDM ajusta 500 picos, dentre estes, apenas 16 significantes e que correspondem aos picos genuínos (ampliado no quadrante superior).

Com o objetivo de compreender o comportamento do formalismo do KBDM em diferentes SNR, diferentes níveis de ruído foram acrescentados nas simulações, cujos valores quadráticos médios (RMS, *Root Mean Square*) foram: 1E-6, 2E-6, 5E-6, 1E-5, 2E-5, 5E-5, 1E-4, 2E-4, 5E-4. Foram simulados dez espectros com cada um dos valores RMS de ruído anteriormente citados. Cada ruído adicionado foi gerado multiplicando uma distribuição aleatória, gaussiana, de média zero, desvio padrão unitário, e sem correlação entre a parte imaginária e real, por seu valor RMS. Para servir de referência, foi calculado o valor RMS do ruído de alguns dos dados adquiridos de *phantoms* com o sistema de 2 T (abordados no próximo tópico). Utilizou-se a região que a $SNR \ll 1$ da componente real do FID experimental (25% dos pontos finais) para calcular o desvio padrão, fez-se isto para cada um dos cinco dos experimentos realizados. Devido à diferença de escala entre o espectro simulado e o experimental, inicialmente, calculou-se a SNR do FID experimental, pela divisão da área do pico principal do NAA e o desvio padrão. O valor da área foi dada pelo AMARES. Posteriormente, visando manter a mesma SNR e conhecendo a área do NAA da simulação, determinou-se o desvio padrão do ruído a ser adicionado aos dados simulados. Este valor foi multiplicado, separadamente, por duas distribuições de ruídos descorrelacionadas, com as características análogas ao ruído descrito anteriormente, e somou uma delas à componente real do FID e a outra à componente imaginária. Fez se todo este processo para cinco dos espectros experimentais que foram adquiridos sequencialmente para o mesmo protocolo e *phantom*. Calculando o RMS do FID com este nível de ruído, verificou-se que todos estavam na ordem de 2E-5, e que a média era de 2,3E-5. Apesar de ter calculado a SNR dos FIDs, por uma questão de simplificação, utilizarei apenas o valor RMS para definir o nível de ruído.

Todos os sinais foram truncados nos 1000 pontos iniciais para o processamento. A figura 24 ilustra alguns dos espectros com alguns dos níveis de ruídos.

Figura 24 – Espectros simulados com diferentes níveis de ruído: (a) com o RMS do ruído de $2,3\text{E-}5$ (valor experimental médio dos espectros adquiridos de *phantoms* com o sistema de 2 T), (b) $1\text{E-}4$ e (c) $5\text{E-}4$.

Para a quantificação dos metabólitos, consideramos as lorentzianas cujas frequências (f) se encontravam dentro de um intervalo ($2d$), isto é, $f \pm d$, e FWHM entre $[0, 2d]$, com d assumindo os valores da tabela 3 para os principais picos. Estes intervalos foram determinados pela observação do FWHM de cada pico de interesse no espectro, o que garante que todas as lorentzianas que ajustam aquele pico sejam contabilizadas para a quantificação.

Tabela 3 – Valores utilizados para selecionar as lorentzianas que ajustam os picos que gostaríamos de quantificar. A frequência corresponde o valor central de frequência do intervalo (d).

Metabólitos	Frequência (ppm)	Intervalo [d] (ppm)
NAA	2.00	0.020
Cr	3.04	0.027
Cho	3.22	0.023
M-Ins	3.57	0.016
Glu	2.36	0.023

A figura 25 retrata a evolução dos valores da quantificação dos principais picos dos metabólitos de interesse clínico em relação ao RMS do ruído. As barras de erros da figura representam o desvio padrão das dez medidas realizadas.

Figura 25 – Média das amplitudes dos principais picos dos metabólitos de maior aplicação clínica, extraídas dos dez espectros simulados, em função do RMS do ruído.

Considerando a média e o desvio padrão, o KBDM quantificou corretamente todos os picos até o nível de RMS máximo de $5E-4$. Entretanto os valores para o nível maior de ruído apresentaram os desvios padrão do ajuste, relativos a média, muito altos - Cho (66%), Cr (22%) e NAA (15%), principalmente os dos metabólitos de baixa SNR - como MIns (91%) e

Glu (136%). É importante enfatizar que este nível de ruído é extremamente alto e, geralmente, está muito acima do ruído presente nas rotinas clínicas ou em pesquisa. Outro aspecto que deve ser considerado nos ajustes, é que a imprecisão geralmente é maior nos ajustes dos picos de baixa SNR, por isto, picos como o Glu e o MIns, por exemplo, cujas amplitudes e, consequentemente, as SNR, estão na ordem de 10% da amplitude do NAA, exibem desvios padrão relativos às médias muito maior que os demais picos.

Continuando a análise de valores altos de ruídos, só que agora para o RMS de $1E-4$ (cinco vezes maior que o ruído obtido para nossos dados experimentais). Neste caso, a Cr e o NAA apresentaram desvios relativos baixos (4% e 5%, respectivamente), porém, o Glu foi de 23% e o MIns de 19%. Para o nível de ruído próximo dos espectros experimentais (RMS $2E-5$), os desvios relativos foram aceitáveis, a maioria não chegava a 5% - NAA (3,6%), Cr (3%), Glu (4%), Cho (4%), MIns (8,6%). Já para presença menor de ruídos, de RMS até $1E-5$, a maioria dos picos quantificados apresentaram desvio padrão relativo a média menor que 1%.

O que é importante notar é que até a ordem dos valores experimentais de RMS a quantificação foi bastante precisa e acurada, além do que, para este método não precisa que sejam identificados todos os picos em sobreposição, como no caso do NAA que está sobreposto ao GABA, Glx2, NAAG, para quantificar um pico específico de forma acurada. A quantificação pode ser feita para um pico individual ou para vários concomitantemente, uma vez que os parâmetros de todos os picos já foram pré-determinados e listados pelo processamento. Isto é uma vantagem quando comparado com o que ocorre em várias técnicas amplamente utilizadas ⁷¹. Um exemplo a ser citado é o AMARES (abordado na seção 3.4.4.2.1) algoritmo pertencente a um software bastante utilizado para análise espectral, o jMRUI. Se o usuário selecionar e entrar com conhecimento a priori de apenas alguns picos, ignorando picos em *overlap* ou componentes da linha de base, por desconhecimento ou desinteresse, a quantificação provavelmente ficará superestimada.

Para embasar melhor as análises experimentais, realizamos também um teste da sensibilidade do método para pequenas variações de um dos metabólitos. Uma possível aplicação na qual isso seria importante seria para o processamento de dados de espectroscopia funcional. Baseados em estudos de MRS do córtex visual humano normal, em que a variabilidade de concentração detectada para estimulação visual do NAA foi de 7% a 20% ^{98; 99; 100; 101}, escolhemos variar a concentração do seu pico mais proeminente, que possui *chemical shift* de 2,0 ppm, acrescentando: 5% e 10% a mais ao seu valor da tabela 2. A amplitude utilizada, portanto, para simulação do pico de NAA para a variação de 5% foi de

3,10E-3 u.a., e para 10% de 3,25E-3 u.a. Os demais picos foram simulados com os mesmo parâmetros da tabela 2. Agora, para cada uma das variações de NAA, foram gerados novamente 10 espectros para cada um dos nove distintos níveis de ruídos, sendo que eles foram gerados do mesmo modo descrito anteriormente.

Figura 26 - Quantificação do pico NAA em função do nível de ruído, para os valores originais de concentração, com aumento de 5% do NAA e 10%. Todos os valores foram normalizados para 100.

Análise estatística feita com o teste T de Student mostrou que para os valores de RMS menor ou igual a cinco vezes o valor experimental (1E-4), o método se apresentou sensível à variação mínima de 5% (considerando um nível de significância de $p < 0,05$). Inclusive isto pode ser observado na figura 26. Para níveis de ruído maiores, a técnica é sensível à variações maiores que 10%.

A seguir, a tabela 4 apresenta os valores de quantificação feita pelo KBDM para as variações de concentração do NAA, com seus respectivos desvios padrão. Eles são comparados às amplitudes (valores teóricos) utilizadas para simular o espectro para um nível de ruído similar ao experimental. Esta tabela fundamenta o que foi discutido no parágrafo

anterior, que o método possui sensibilidade suficiente para pequenas variações de concentração para níveis normais de ruído.

Tabela 4 - Quantificação feita do NAA pelo KBDM em espectros simulados com pequenas variações de concentração com o RMS similar ao ruído experimental (RMS de $2,3E-5$).

Concentração	Amplitude do Pico (u.a.)		Desvio padrão	Variação da Amplitude Medida/Original
	Teórico	Medida(KBDM)		
Original	0,002955	0,00298	0,00006	
5%	0,003103	0,00311	0,00004	4%
10%	0,0032505	0,00323	0,00004	8%

Dos dados simulados, podemos concluir que a técnica proposta tem um bom desempenho e sensibilidade suficiente para a quantificação de dados cujas linhas são lorentzianas, e que possuem ruídos de RMS menores que $1E-4$, o que abrange geralmente o nível de ruído das rotinas clínicas. O KBDM também tem a vantagem de não precisar conhecer e selecionar todas as componentes que sobrepõem ao pico de interesse para a sua quantificação, além de que, o método apresenta um grande potencial para ser aplicado em dados truncados. Deve-se enfatizar que a sensibilidade admitida para níveis normais de ruído pela técnica, e a possibilidade de truncamento, sugere possível aplicação em experimentos de neuroespectroscopia de carácter funcional.

5.3 Análises Experimentais

5.3.1 Materiais e Métodos

Para comparar a quantificação feita com o KBDM utilizando dados experimentais, escolhemos o software jMRUI 5.0¹⁰². Essa escolha ocorreu pelo fato de que o jMRUI é um software de domínio livre, baseado na linguagem Java, amplamente usado no processamento de dados de pesquisas¹⁰³⁻¹⁰⁹ de MRS *in vivo*, com uma interface gráfica amigável e de fácil manipulação. Suas funções permitem que seja realizado todo o pré-processamento dos dados

além da quantificação dos mesmos de maneira relativamente simples. Dos métodos disponíveis pelo jMRUI para quantificação, escolhemos o AMARES (*Advanced Method for Accurate, Robust, and Efficient Spectral fitting*), um método iterativo no domínio do tempo para uma estimativa precisa e eficiente dos parâmetros de sinais de MRS através do uso de *prior knowledge*⁷¹.

5.3.1.1 O equipamento de RM

Foram feitos experimentos em dois sistemas de ressonância diferentes. O primeiro aparelho de RM utilizado está disponível no laboratório e é formado por um magneto supercondutor horizontal com campo de 2 Teslas da *Oxford Instruments*, modelo 85310HR, que opera em conjunto com uma eletrônica Bruker®, Avance III com um sistema de banda larga (2 a 400 MHz) com dois canais de transmissão e quatro canais de recepção, de aquisição paralela, com 15 canais de *shimming*, gradientes de 16 Gauss/cm, dois amplificadores de RF de 1 e 2 kW respectivamente. Para aquisição dos dados, foi utilizado o software padrão do equipamento Paravision 5.

O segundo sistema de RM consistiu em um Achieva 3.0 Teslas (Philips Medical Systems, Holanda) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, equipado com gradientes capazes de gerar amplitudes de 80 mT/m e 200 mT/m/ms de tempo de subida. Uma bobina transmissora de corpo foi utilizada em conjunto com uma bobina receptora de 8 canais, aplicada para cabeça de humanos.

5.3.1.2 Os phantoms

Os phantoms foram construídos com materiais apropriados para o ambiente de ressonância magnética - PVC e vidro, e em um formato que permitisse uma distribuição homogênea da solução em seu interior.

Foram moldados dois modelos de *phantoms*, um para as dimensões da bobina animal do sistema da Bruker, que denominaremos *Phantom A*, e um maior, para a bobina de cabeça do sistema da Philips, que chamaremos de *Phantom B*, detalhados nos próximos subtópicos.

A solução utilizada continha dissolvidos os principais metabólitos cerebrais, cujas relações entre as suas concentrações eram as mesmas do córtex de um paciente saudável, como estão especificadas no próximo tópico. A diferença entre o modelo A e B, além do formato, está na concentração total dos metabólitos para a obtenção de uma SNR adequada para processamento (cinco vezes para o modelo A e uma vez para o B). Já entre os *phantoms* do mesmo tipo, foi acrescido NAA na solução base, de forma a garantir variações de 5% neste metabólito, o que possibilitou o estudo de sensibilidade da quantificação.

5.3.1.2.1 Solução base dos *phantoms*

Para se construir os *phantoms* do ambiente bioquímico proporcionado pela presença de metabólitos no cérebro, foram utilizados os seguintes metabólitos, todos adquiridos na empresa Sigma Aldrich:

- Creatina (anidro), acima de 98% de pureza (Código do produto: c0780)
- Glutamato, 99% de pureza. (Código do produto: 49449)
- Cloreto de Colina, mais de 98% de pureza. (Código do produto: C7527)
- Ácido N-acetil-aspartato, com pureza maior que 99%. (Código do produto: 00920)
- Mio-Inositol, com pureza maior que 99%. (Código do produto: 57570)

Comparações entre experimentos que retratam a distribuição regional dos metabólitos cerebrais podem ser encontradas na literatura ¹¹⁰. Baseando-se em um destes estudos ¹¹¹, adotamos as relações observadas entre as concentrações molares dos metabólitos da matéria cinzenta do lóbulo Parietal humano, em um campo de 2.0 T. A escolha pela região Parietal do córtex foi devida à alta frequência de estudos funcionais neste lóbulo. A tabela 5 traz estes valores de concentração.

Tabela 5 - Concentrações molares dos metabólitos para a matéria cinzenta do lóbulo Parietal humano em um campo de 2.0 T ¹¹¹

	Cr	NAA	Cho	M-Ins	Glu	Gln
Concentração Molar (mM)	6,5	8,2	1,10	4,3	8,2	3,8
Erro (mM)	0,6	0,8	0,14	0,7	1,1	1,4

Além dos metabólitos, foram acrescentadas algumas outras substâncias:

- Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 , para compor uma solução tampão que estabilizasse o pH.
- HCOONa e DSS, substâncias utilizadas como marcadores por gerarem singletos que definem os desvios químicos padrão de 8.44 ppm e 0 ppm, respectivamente.
- NaN_3 , responsável por evitar o desenvolvimento de micro-organismos na solução.

Na tabela 6, estão listadas estas concentrações utilizadas, definidas a partir da composição do phantom específico para controle de qualidade de espectroscopia por RM. Essa especificação pode ser encontrada no capítulo 8 do manual do software LCModel ¹¹².

Tabela 6 - Concentração de algumas substâncias utilizadas no phantom: solução tampão, marcadores e NaN_3

	DSS	K_2HPO_4	KH_2PO_4	HCOONa	NaN_3
Concentração	1 mM	72 mM	28 mM	200 mM	1 g/L

A balança utilizada, para pesar as substâncias, possuía uma precisão de $\pm 0,0001 \text{ g}$.

5.3.1.2.2 *Phantoms A*

Os *Phantoms A* foram construídos com PVC, ocos, com superfície interna esférica, e superfície externa cilíndrica, como mostrado na figura 27. A preferência por uma parede interna esférica foi para que houvesse uma distribuição homogênea do volume da solução, minimizando, portanto, efeitos de inhomogeneidade de campo.

Figura 27 - *Phantoms* de PVC, que denominamos tipo A, desenvolvidos para o experimento.

Os *phantoms* A foram construídos com as seguintes dimensões:

- Diâmetro: $3,000 \pm 0,005 \text{ cm}$
- Volume: $14,14 \pm 0,06 \text{ ml}$

Uma seringa foi utilizada para preencher, através de um único furo, o *phantom* com a solução desejada. Quando este se encontrava cheio, a seringa sem a agulha, repleta da solução, foi rosqueada ao furo, como se pode ver na figura 27, atuando, assim, como compensador da pressão interna do *phantom*. Posteriormente, o *phantom* foi levemente agitado para se retirar as bolhas, que subiam pela seringa, minimizando, assim, possíveis artefatos, durante a aquisição, devido à variação de susceptibilidade.

Ao todo, foram feitos 6 *phantoms*, com cinco vezes a solução base anteriormente especificada, com a diferença apenas de pequenos acréscimos de NAA de: 0%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25% da concentração original.

Para as aquisições, foi necessário enrolar cada *phantom* em uma espuma, fina e de espessura uniforme, posicionando-os na região central da bobina de radiofrequência desenvolvida localmente¹¹³, como ilustra a figura 28.

Figura 28 - *Phantom A* inserido na bobina.

5.3.1.2.3 *Phantoms B*

Correspondem a cinco balões de vidro esférico de fundo chato, com capacidade de 250 ml, como ilustrados na figura 29.

Figura 29 - *Phantoms* de vidro, tipo B, capacidade de 250 ml cada.

Como já foram mencionados, estes *phantoms* foram preparados com a solução base sem a necessidade de fazê-la mais concentrada, uma vez que devido ao seu tamanho maior, os

voxels de aquisição puderam ser definidos maiores que o do *Phantom A*, e obter, conseqüentemente, maior intensidade de sinal. A variação entre os *phantoms* foi apenas de pequenos acréscimos de NAA de: 0%, 5%, 10%, 15% e 20% da sua concentração original.

5.3.1.3 Protocolos de aquisição

Para as aquisições feitas com a bobina para experimentos em pequenos animais utilizou-se a sequência de pulsos PRESS com *voxel* único de 12x12x12 mm, com TE = 30 ms e tempo de repetição adequado para o sistema de spins relaxar completamente antes do início do próximo experimento (TR= 3000 ms). Adquiriu-se 4096 pontos com largura de banda (SW) de 2000 Hz e 128 médias. O ajuste de *shimming* foi feito através da rotina MapShim do aparelho, que faz o *shimming* automaticamente com base em uma configuração previamente feita pelo usuário. A sequência PRESS foi combinada com pulsos de RF de supressão de volume externo (OVS) e supressão da água, VAPOR (VARIABLE Power and Optimized Relaxation delays). Para garantir um melhor resultado, a VAPOR foi otimizada para cada experimento, sendo feito um ajuste manual fino. Com essa configuração é feita uma supressão do sinal proveniente do volume externo ao *voxel* selecionado, além da sua localização espacial, para evitar contaminação. Já a supressão do sinal da água é realizada para que os metabólitos, que têm, em sistemas biológicos, concentração tipicamente 10000 vezes menor que a da água, possam ser observados. A eficiência na supressão do sinal da água depende da calibração adequada da potência dos pulsos de RF utilizados para tal. Esse procedimento é extremamente crítico para a obtenção de dados de qualidade. No caso deste sistema, em particular, antes do processamento, foi necessário retirar os 68 primeiros pontos de todos os FIDs, por trazerem informação transiente do filtro digital utilizado na aquisição dos dados.

Para adquirir os espectros do *Phantom B*, foi aplicada também a sequência de pulsos PRESS, com TE/TR = 30/2000ms, valores suficientes para o sistema poder relaxar completamente entre as aquisições e visualizar todos os metabólitos. Utilizamos ainda um *voxel* de 25x25x25 mm para adquirir 2048 pontos com SW de 2000 Hz e 128 médias (a exceção está no estudo de RSN que se fez variando o número de médias). O *shimming* utilizado foi realizado de forma completamente automática e para a supressão de água, foi utilizada a sequência de pulsos oferecida pela máquina: CHESS³⁶.

Com o objetivo de evitar repetições desnecessárias durante o texto, denominaremos “Protocolo 1” a primeira metodologia descrita, que é definida tanto pelo protocolo de aquisição quanto pelo uso de *phantoms* modelo A no sistema de RM de 2T. Para o protocolo estabelecido para o sistema de humanos de 3T, com *phantoms* B, designaremos “Protocolo 2”.

Foram feitos vários estudos para avaliar a reprodutibilidade, eficácia e vantagem do processamento utilizando o método KBDM em espectros adquiridos *in vitro*, para posterior aplicação *in vivo*. E estes estudos serão divididos e apresentados da seguinte forma:

- Reprodutibilidade;
- Eficiência em truncamento;
- Remoção do pico residual da água;
- Avaliação de sinais adquiridos sem supressão da água;
- Quantificação em espectros com variação da:
 - SNR;
 - Concentração de metabólitos específicos.

5.3.2 Resultados e Discussões

5.3.2.1 Reprodutibilidade

Para verificar a estabilidade do método, adquirimos dois conjuntos de dados, um com o Protocolo 1 e outro com o Protocolo 2. O *phantom* utilizado foi o de 0% de acréscimo de NAA, que denominaremos PhA0, aquele feito para a bobina animal e PhB0, para bobina de cabeça. No primeiro caso, foram feitas dez aquisições exatamente iguais encadeadas e no segundo, apenas cinco aquisições. O número de aquisições não foi igual nos dois experimentos devido ao tempo restrito para realizar os experimentos no aparelho de RM de humanos. Todos os dados foram processados utilizando o método convencional baseado no formalismo de Fourier e o KBDM, como está ilustrado na figura 30, para os dados adquiridos com o Protocolo 1 e figura 31, para o Protocolo 2. Para a aplicação do KBDM, foi necessário truncar em 2800 pontos iniciais, os FIDs do PhA0, e em 1500, os FIDs do PhB0.

A escolha de truncar o sinal foi baseada no fato que o KBDM interpreta o ruído no sinal da mesma forma que interpreta o sinal. Desta forma, o método tenta ajustar curvas que melhor descrevam o ruído, o que pode dar origem a picos espúrios no espectro resultante, e, também, comprometer o ajuste dos picos de interesse, por uma matriz superdimensionada. Desta forma, todo o processamento utilizando o KBDM é realizado utilizando apenas os pontos nos quais o FID apresenta SNR maior que um ¹¹⁴. O número de pontos escolhido para o truncamento é baseado na avaliação dos FIDs, da sua relaxação, da SNR em função do tempo, além da necessidade de se fazer alguns testes, verificando se houve perda de informação. Quando há variações entre espectros para a mesma sequência, amostra e truncamento, um das causas mais comum é a diferença na qualidade supressão da água de um experimento para outro, e do *shimming* do campo, que afeta diretamente a relaxação e o sinal dos metabólitos e da água.

Figura 30 – Espectros adquiridos do PhA0 com o Protocolo 1 processados por (a) FT (b) KBDM

Figura 31 – Espectros adquiridos do PhB0 com o Protocolo 2 processados por (a) FT (b) KBDM

Qualitativamente, é possível verificar como são sutis as diferenças entre os processamentos utilizando a mesma metodologia. Em ambos os casos, se pode notar que o formalismo é bastante estável no que se refere à reprodutibilidade dos dados obtidos, mesmo para os casos em que os dados apresentam artefatos notáveis, que é a situação da figura 30,

onde há presença considerável de *eddy current* e um *shimming* de pior qualidade. Isso demonstra a fidelidade e robustez do método para ajuste de linhas espectrais.

Na figura 30(b) e figura 31(b), observam-se algumas linhas que não pertencem aos dados originais. Na realidade, estes “pequenos picos”, são apenas pontos espúrios, como estão exemplificado nas figuras abaixo. Geralmente, estes picos apresentam linhas muito estreita se comparado com os picos genuínos, sendo possível identifica-los aumentando a interpolação, uma vez que eles continuaram sendo definidos apenas com um ponto. Para a sua eliminação, basta empregar filtros que identifiquem estes pontos isolados, como por exemplo, um filtro passa alta na lista de FWHM das linhas, definindo uma largura mínima, que além de remover estes pontos espúrios, pode servir também, dependendo do valor definido, como filtro de ruído.

Figura 32 – Indicação de alguns pontos espúrios após processamento pelo KBDM dos FIDs correspondentes do:
(a) Espectro 6, Protocolo 1 (b) Espectro 1, Protocolo 2.

5.3.2.2 *Truncamento*

Verificamos, também, o potencial do método para trabalhar com dados truncados. Em outra aquisição com o Protocolo 1, aplicamos o KBDM para processar o FID, sendo que neste fizemos diferentes reduções no número de pontos adquiridos, o que implicaria em um tempo diferente total de aquisição. O FID com as indicações da distribuição dos truncamentos e o espectro com estes truncamentos, estão representados na figura 33(a) e (b), respectivamente.

Figura 33 – (a) Indicações no FID das posições em que foram feitos os truncamentos. (b) Os espectros gerados pelo KBDM pelos FID com diferentes truncamentos, comparados ao gerado pela FT do FID completo.

Das figuras, observa-se que, como ocorreu com os valores simulados sem ruído, o KBDM é eficiente em ajustar o espectro em um tamanho menor que o rotineiramente adquirido, neste caso, para até 14% do tamanho original do FID (truncamento nos 600 pontos iniciais, uma vez que em 500 ele começa a perder resolução). O método ajustará não somente os picos genuínos mas também o ruído, quando existir no FID, sem fazer qualquer distinção. .

Como o ruído é aleatório, ele requer muitas lorentzianas para ajustá-lo. Por isto, quando se faz o truncamento, exclui-se a faixa do FID em que a presença de ruído é maior que a do sinal, aumentando, conseqüentemente, a SNR do sinal que será processado. Devido a este aumento da SNR, e diminuição dos dados de entrada, haverá uma redução no número de linhas a serem ajustadas pelo KBDM, o que resultará em um processamento mais rápido e um espectro menos ruidoso. Esta é também uma grande vantagem da técnica, porque, além de permitir truncar o sinal sem perda de resolução e sem artefatos, ele atua também como um filtro para atenuar ruídos, e que será melhor ilustrado e abordado no tópico “Quantificação”.

Embora o truncamento mínimo para gerar espectros sem perda de resolução espectral obtido para os espectros experimentais é maior que o simulado sem ruído, 14% ainda é uma redução significativa. Como foi anteriormente discutido, a presença do ruído no sinal exige muitas lorentzianas para ajustá-lo, aumentando, assim, o número mínimo de dados de entrada que o KBDM precisa para gerar um espectro correto. Por isto, foi necessário muito mais pontos quando comparado ao processamento do sinal sem ruído.

Estes resultados podem implicar em uma economia de tempo de experimento, o que em qualquer hospital é essencial, além de que, quanto maior o tempo de aquisição, maior a possibilidade de ocorrer artefatos devido ao movimento do paciente. É importante, no entanto, frisar, que exige um tempo de repetição mínimo que se deve respeitar, independente do método de processamento utilizado a posteriori. Este valor se baseia principalmente no tempo de relaxação T_1 dos metabólitos, cujos valores para os diferentes campos podem ser encontrados na literatura. Já que a técnica pode atuar como filtro natural de ruído, e processa sinais curtos com melhor acurácia que a FT, outra vantagem seria a possibilidade de usar esta ferramenta para estudos que exijam um boa resolução temporal.

5.3.2.3 *Remoção do pico residual da água*

Com o KBDM, várias estratégias para eliminar componentes do sinal podem ser usadas aproveitando a diferença de algumas propriedades dos picos a serem removidos dos demais. Por exemplo, mesmo com o uso de pulsos de RF para a supressão, há sempre, no FID adquirido, o sinal residual da água. A supressão permite que a linha da água, que é milhares de vezes maior que dos metabólitos²¹, se torne apenas algumas dezenas, ou mesmo unidades,

maior. Embora este resultado seja muito bom, esta componente residual, geralmente, continua a afetar a linha de base, precisando ser removida para uma quantificação eficiente e acurada dos metabólitos. Duas abordagens distintas são as mais usadas (e também aplicáveis com algumas modificações para a remoção de outros sinais): (1) a utilização de um sinal que seja aproximado à água do espectro adquirido e sua subtração do FID original; (2) a eliminação do sinal de água pelo uso de filtros especiais ⁴¹.

O ajuste, descrito pelo primeiro método, pode ser executado por meio da comparação entre o pico de água de aquisições feitas sem supressão, denominados espectros de referência, e o original. Para garantir o sucesso, obter a aproximação correta do sinal da água é essencial. No entanto, o processo funciona bem apenas se o pico residual da água não se apresenta distorcido, o que não é geralmente o caso após a execução de uma supressão da água eficiente ⁴¹, isto é, quando se consegue suprimir a água tal que o seu pico residual é no máximo algumas dezenas de vezes maior que a amplitude máxima dos metabólitos. Outra alternativa é ajustar o FID original por um método no domínio no tempo, e consequentemente, o sinal da água. Através da análise dos parâmetros do espectro, pode-se eliminar as lorentzianas que ajustam a água - trataremos isto com mais detalhes para o método proposto posteriormente neste tópico.

A segunda possibilidade é a de utilizar o fato que a água ressoa a uma frequência diferente do que a dos metabólitos. Por conseguinte, os filtros para uma gama de frequências definida podem ser aplicados ⁴⁸. Assumindo que a água ressoa na frequência zero (ou que pode ser deslocado para a frequência zero posteriormente), o sinal da água é obtido por filtro passa-baixa e subtraído do FID ou, alternativamente, o filtro passa-alta do FID produz um espectro sem água.

Se ampliarmos o espectro adquirido no tópico anterior (5.3.2.2) ao redor de 4.7 ppm, notaremos que muito embora tenha sido utilizada uma técnica para supressão do sinal da água, é possível notar claramente um sinal residual, vide figura 34. A proporção das áreas entre o pico da água e os metabólitos varia conforme a eficiência dos pulsos responsáveis pela supressão, neste exemplo a relação foi de aproximadamente 17 vezes. Este sinal remanescente compromete a adequada avaliação dos metabólitos de interesse, uma vez que dada sua largura, sinais dos metabólitos mais próximos se sobrepõem a ele, como pode ser visto na figura 34.

Figura 34 - Espectros analisados pelo KBDM, do PhA0, original. O pico residual da água se encontra por volta de 4,7 ppm e é aproximadamente 17 vezes maior que o maior pico dos metabólitos (NAA).

Submetemos, então, esse sinal ao processamento utilizando o KBDM. Como resultado, obtivemos uma lista composta por quatro parâmetros (amplitude, frequência, fase inicial e T_2^*) para cada lorentziana encontrada pelo algoritmo. Os valores obtidos para as amplitudes dos picos e os respectivos desvios químicos estão mostrados na figura 35.

Figura 35 - Lista de todos os picos determinados pelo método, com suas respectivas amplitudes e desvios químicos. O quadrante superior mostra os valores obtidos que compõem o pico da água.

Uma análise da distribuição das amplitudes dos picos ao longo dos diversos desvios químicos demonstra que em torno de 4.7 ppm encontramos picos com até duas ordens de grandeza maiores que a maior parte dos picos remanescentes. Isso é consistente com o que se pode notar através da análise do espectro mostrado na figura 34, que sugere que esses pontos em 4.7 ppm sejam de fato componentes do pico residual da água. Utilizando um processo que chamamos de edição da lista de parâmetros, removemos os picos do sinal original, mostrados no gráfico menor no quadrante superior da figura 35. O resultado dessa operação pode ser visto na figura 36.

Figura 36 - Espectro original mostrado em verde, a linha da água na cor preta - determinada a partir dos picos selecionados na figura anterior, e o espectro remanescente (vermelho) - após a remoção do pico residual da água.

Como é possível observar, o processo de remoção do pico da água a partir da seleção dos picos obtidos pelo método KBDM é bastante eficiente. É importante notar que todas as componentes do sinal remanescente da água foram removidas sem que o sinal de interesse fosse comprometido. Como resultado, a distorção gerada pela cauda do pico da água nos metabólitos mais próximos de 4.7 ppm também foi removida e a linha de base do espectro processado não apresenta nenhuma distorção que possa comprometer a adequada análise espectral do dado. Isto demonstra que dentre as aplicações encontradas para o método, o

mesmo poder ser aplicado para remover picos que não sejam de interesse, e que, eventualmente, possam estar deformando a linha de base.

5.3.2.4 *Remoção da água sem pulsos de supressão*

A possibilidade de edição da lista de parâmetros pelo KBDM e, conseqüentemente, da remoção precisa de picos a partir do ajuste do FID têm inúmeras vantagens. Entre elas, deve-se enfatizar a perspectiva de analisar sinais sobrepostos e, assim, aumentar a precisão da estimativa das áreas. Para os métodos de processamento atuais, a quantificação acurada de sinais com picos justapostos continua sendo um desafio. Outro argumento para a necessidade da supressão de algumas componentes do sinal é o fato dos artefatos normalmente serem dimensionados com a intensidade do sinal e, portanto, até mesmo pequenas distorções das caudas de um pico de grande intensidade, por exemplo, podem perturbar os sinais das ressonâncias com intensidades muito mais baixas⁴¹. Um exemplo típico é o pico da água em ¹H MRS *in vivo*, cuja prática comum é suprimi-lo durante a medição, para uma aquisição mais confiável e consistente do espectro dos metabólitos, uma vez que os picos dos metabólitos estão frequentemente sobrepostos sobre a sua cauda da linha larga. Mais detalhes sobre esta supressão podem ser encontrados na seção 3.4.1.3. Outra razão, é devido ao tamanho do *range* dinâmico do receptor. O *range dinâmico* sempre se ajusta para acomodar o maior sinal, e, em experimentos *in vivo* sem supressão da água, a maior componente do FID é a água. Dependendo do tamanho do *range* com relação a diferença de intensidade entre o maior e menor pico pode ocorrer o comprometimento da definição dos picos dos metabólitos. Conseqüentemente, a precisão da representação digital do FID ficará prejudicada, conduzindo a erros nas alturas de picos e, conseqüentemente, uma redução na relação SNR. Contudo, existem algumas boas razões para não utilizar os pulsos de supressão e fazer isto somente no pós-processamento.

Devido à falta de homogeneidade do campo magnético e pela natureza de multi-compartimento do sinal da água, a supressão de água nunca é perfeita e frequentemente um sinal residual da água permanece no espectro. Este resíduo apresenta muitas vezes um formato de linha de aspecto complicado, o que é problemático quando o espectro deve ser processado por um método de processamento exigindo a parametrização dos picos do FID⁴¹.

Outra justificativa para o uso de técnicas que permitam quantificar os metabólitos a partir dos dados sem supressão, é que o sinal da água pode ser utilizado como um padrão interno para a quantificação e para a correção de correntes induzidas, sem a necessidade de quaisquer aquisições adicionais para referência ⁴¹. Por estas razões, métodos a posteriori de remoção da água de forma efetiva são de grande importância.

Para consolidar as vantagens da possibilidade de manipulação da lista de parâmetros do ajuste feito no domínio do tempo pelo KBDM, vamos demonstrar que conseguimos separar os metabólitos da água para um FID medido sem aplicação de pulso de supressão de água. Para este experimento foi utilizado o *phantom* PhA0, e Protocolo 1 sem utilização dos pulsos da VAPOR. No espectro original, como era esperado, o pico da água apresenta a amplitude 600 vezes maior que o maior dos picos dos metabólitos, como se pode visualizar na figura 37.

Figura 37 – Espectro adquirido com Protocolo 01 sem pulso de supressão da água, para o *phantom* PhA0. O quadrante superior amplia a região dos metabólitos para mostrar a superposição deles com a água.

A figura 38 apresenta o ajuste dos dados, após a remoção da linha da água. Por um processo muito similar ao procedimento explicado na seção anterior, retirou-se as lorentzianas que possuíam amplitudes maiores que a do maior pico dos metabólitos (pico do NAA em 2,0 ppm), e reproduziu-se o espectro a partir do sinal residual com o KBDM.

Figura 38 – Remoção da água ao fitar apenas as lorentzianas cuja amplitude fosse menor que a amplitude do pico do NAA. E após isto foi processado os dados com o KBDM.

Observa-se que o espectro está corretamente reproduzido, embora haja presença marcante de correntes induzidas, como no caso da figura 30, o que dificulta uma análise quantitativa da área.

5.3.2.5 Quantificação

Outra possibilidade de aplicação da técnica que exploramos é a quantificação dos metabólitos. Fizemos isto analisando espectros de SNR distintos e com pequenas variações de concentração de um dos metabólitos. Apoiados no fato que temos acesso à lista de parâmetros dos espectros, podemos identificar as lorentzianas que ajustam um determinado pico dado um intervalo de frequência e/ou largura de linha, como já foram feitos para as simulações (seção 5.2).

Para estudar o comportamento do método, utilizamos o Protocolo 2 com o *phantom* PhB0, alterando a SNR através de diferentes números de médias (NSA, *number of signal averages*) adquiridas: 128, 96, 48, 32 e 16. Para cada NSA, foram feitas cinco aquisições. Para o processamento com KBDM, os FIDs foram truncados em 1500 pontos, excluindo o pico residual da água, e, fazendo-se uso do FID remanescente correspondente, truncamos novamente em 1000 pontos, obtendo o espectro resultante, como está exemplificado na figura

39(a) e (b), respectivamente. O primeiro truncamento é feito com o objetivo de facilitar o ajuste pelo KBDM, para que ele seja mais rápido e eficiente, uma vez que se seleciona apenas a região do FID que apresenta SNR significativa, isto é, maior que um. Posteriormente, remove-se o pico residual da água, e com o sinal remanescente, que contém apenas os metabólitos, reavalia-se o sinal. Dessa forma, trunca-se mais apropriadamente o FID de maneira a manter apenas a parte do sinal que efetivamente contém informação de interesse ($\text{SNR} > 1$).

Figura 39 – Componente real de um FID adquirido pelo Protocolo 2 do PhB0, com NSA 128 médias em duas etapas: (a) FID original com marcação em 1500 pontos, onde foi feito o primeiro truncamento. (b) FID dos metabólitos com a marcação do truncamento em 1000 pontos– após o processamento por KBDM do sinal de (a), foi retirada o sinal residual da água e a partir das linhas remanescentes, reconstruído o FID que contém essencialmente só as componentes metabólicas.

A figura 40 mostra o espectro nos dois extremos da SNR: o melhor, NSA de 128 e o pior, NSA 16.

Figura 40 – Exemplo de espectros adquiridos com o Protocolo 2 para o *phantom* PhB0 com o menor valor de NSA, 16, e o maior, NSA de 128, ambos foram preenchidos de zeros (FID com tamanho total de 5000 pontos) e processados com a FT.

Na literatura, há diversas formas de calcular o SNR do espectro^{115; 116; 117; 118; 119; 120}, para o nosso trabalho adotamos a mesma citada na subseção 5.2, definida pela relação entre a área do maior pico dos metabólitos (NAA em 2,0 ppm) desvio padrão do ruído do FID (nos últimos 21% dos pontos adquiridos)¹¹⁸. As áreas foram calculadas a partir do ajuste do NAA feita pelo AMARES do jMRUI 5.0, que nos forneceu as amplitudes dos FIDs. Como o ajuste de cada pico foi feito por uma única lorentziana de fase praticamente nula, calculou-se a área dividindo a amplitude por dois. Os resultados podem ser conferidos na tabela 7. Como esperado, SNR é menor quanto menor é o NSA, embora, se compararmos as proporções entre as diferentes SNR, elas não estejam dentro dos valores esperados (da SNR do NSA de 16 para o de 32, por exemplo, era para ter sido observado uma melhora de 41%; para o de 48, de 73%; para o de 96, 145% e para o de 128, de 183%). Esta diferença do valor esperado para o valor obtido experimentalmente, aumenta conforme se eleva o número de médias. Uma explicação plausível está na forma de realizar o experimento. Para posicionar o *phantom* no centro do aparelho de RM inicialmente, foi necessário movimentar a cama em que ele se encontrava. Após centralizado, iniciou-se prontamente o experimento, e as aquisições foram feitas sequencialmente em ordem decrescente de médias. O que pode ter ocorrido é que a solução

pode não ter se estabilizado completamente após o posicionamento, e esta movimentação remanescente estar presente durante a aquisição, e/ou, o cálculo do *shimming*, justificando assim o aumento do erro com as médias.

Tabela 7 – SNR médio e seu desvio padrão para os 5 espectros adquiridos para cada NSA.

NSA	SNR médio	Desvio padrão
16	14,4	0,5
32	19,3	1,8
48	22,0	2,0
96	28,0	2,0
128	35,0	6,0

Um benefício do emprego do KBDM no ajuste do espectro, como mencionado na seção anterior, é sua atuação como filtro passa-baixa, como comprova a figura 41. Há uma melhora significativa de SNR com o uso da técnica, uma vez que é pode-se eliminar do FID a região que a presença do ruído é superior a do sinal. Este fator auxilia obter quantificações mais acuradas, como será discutido posteriormente.

Figura 41 – Espectros gerados pelo KBDM e FT a partir de um mesmo FID, obtido com o Protocolo 2 e 16 médias, do *phantom* PhB0. Para o processamento do KBDM foi realizado um truncamento nos 1500 pontos iniciais e depois removido o pico da água, e, posteriormente, outro truncamento de 1000 pontos no FID remanescente.

Para fazer a quantificação, consideramos apenas a quantificação do pico do NAA em 2,0 ppm e da Cr em 3,03 ppm, como estudo inicial. No ajuste destes picos, foram consideradas as lorentzianas que se encontravam no intervalo de $\pm 0,039$ ppm para a frequência central do NAA, e $\pm 0,031$ ppm, para a Cr, além de que suas FWHMs podiam ter o limite máximo de duas vezes estes intervalos, isto é, 0,078 ppm para o NAA, e 0,063 ppm, para a Cr. Estes intervalos foram escolhidos a partir da análise visual do espectro obtido. Os espectros mostrados a seguir são exemplos de como ficaram estes ajustes do NAA e da Cr com o KBDM, superpostos sobre a FT do FID original. Além disso, são mostrados também os resíduos obtidos através da subtração do espectro completo e o ajuste dos picos, ambos gerados pelo KBDM. Por esta razão, o resíduo se apresenta menos ruidoso que o espectro gerado pela FT (uma vez que o método atua como um filtro passa-baixa). Para avaliar visualmente a qualidade de uma possível quantificação fundamentada no ajuste feito pela técnica, foi mostrado o ajuste e o espectro residual para todas as médias. Tanto a FT do espectro quanto o ajuste dos metabólitos e o resíduo foram representados com 5000 pontos (para a FT foi necessário completar com 2952 zeros o final do FID), para garantir uma boa interpolação do espectro.

Figura 42 – Exemplos de espectros com diferentes SNR processados com a FT com o FID com preenchimento de zeros (tamanho final 5000 pontos), superpostos com o ajuste dos picos do NAA, 2,0 ppm e Cr, em 3,03 ppm, feitos pelo KBDM, e o resíduo. Cada resíduo, apresentado também com 5000 pontos, foi calculado como a diferença entre o espectro gerado pelo KBDM, que não foi mostrado, e os ajustes do NAA e Cr.

Os valores numéricos das razões das áreas do NAA pela Cr foram colocadas na tabela 8.

Tabela 8 – Relação entre as quantificações dos picos de 2,0 ppm do NAA e 3,03 da Cr dos espectros gerados com diferentes SNR (associada diretamente à variação do NSA) do PhB0 com Protocolo 2 com o KBDM.

NSA	NAA/ Cr	Desvio padrão
16	1,5	0,2
32	1,7	0,2
48	1,4	0,2
96	1,6	0,3
128	1,5	0,4

Embora a precisão da quantificação seja alterada conforme a SNR, o KBDM conseguiu encontrar valores equivalentes para todos os níveis de ruídos estudados, como expõe a tabela 8. Isto se explica pelo fato dele atuar como um filtro passa-baixa, reduzindo o impacto do ruído na quantificação.

A sensibilidade do método para pequenas variações metabólicas, necessária, entre outros exemplos, para experimentos funcionais com MRS^{98; 99; 100; 101}, é importante de ser certificada. Foi feito, com esta finalidade, um experimento para cada um dos *phantoms* do tipo B, com o Protocolo 2. Determinou-se a área dos picos NAA e Cr com o KBDM e o AMARES do jMRUI (para efeito de referência, já que o AMARES é um método já bem estabelecido).

Para o processamento com o KBDM, os FIDs foram pré-processados de forma análoga a já descrita anteriormente: sendo truncados em 1500 pontos, posteriormente, eliminou-se o pico residual da água, e, fazendo-se uso do FID remanescente correspondente, fez-se o ajuste pela técnica após truncamento de 1000 pontos, obtendo o espectro resultante.

Já com o AMARES, utilizaram-se, como *prior knowledge*, valores iniciais de *chemical shift* e FWHM e seus respectivos intervalos - dentro do qual o método deve encontrar os picos a serem ajustados, neste caso, estes limites foram configurados para serem restrições leves (denominada pelo AMARES de *soft constraints*). As especificações adotadas encontram-se na tabela 9. Além disso, outra característica também aplicada foi o uso de apenas curvas lorentzianas com fase fixa (conforme a correção de fase de ordem zero para cada espectro) para o ajuste dos picos.

Tabela 9 – *Prior knowledge* utilizado para o ajuste pelo AMARES do NAA e Cr. Ele consiste nos valores iniciais de *chemical shift* e FWHM e os intervalos destes parâmetros que são dados como restrições leves (*soft constraints*).

Metábolitos	<i>Chemical Shift</i> (ppm)	Intervalo de <i>Chemical Shift</i> (ppm)	FWHM (Hz)	Intervalo de FWHM (Hz)
NAA	1,99	1,9 - 2,1	2,0	0,0 - 5,0
Cr	3,0	2,9 - 3,1	2,0	0,0 - 5,0

Os resultados obtidos com as duas formas de análise espectral estão listados na tabela 10.

Tabela 10 – As áreas do principal pico do NAA para experimentos feitos com o Protocolo 2 nos *phantoms* (tipo B) que apresentavam variação na concentração do NAA. Os ajustes do pico, para o cálculo da área, foram feitos pelo AMARES e pelo KBDM.

<i>Phantoms</i> (Concentração adicional de NAA)	AMARES	KBDM
0%	0,0026	0,0022
5%	0,0025	0,0023
10%	-	0,0021
15%	0,0028	0,0027
20%	0,0029	0,0025

Sobre a questão da sensibilidade do método a pequenas variações de concentração do NAA, comparado ao AMARES, dispostas na tabela 10, não foi possível ter uma precisão adequada. Como foi adquirido apenas um espectro para cada *phantom*, devido ao tempo restrito de uso do sistema, não se pode descartar ou aprovar o método na questão de sensibilidade, a partir destes dados. Mas um fato interessante, foi que o jMRUI não conseguiu quantificar o *phantom* de 10% devido a uma deformação maior da linha de base. Já o KBDM não teve problema, uma vez que, para ele, lidar com linhas de base irregular não representava um grande desafio - outra vantagem do método.

Outro benefício da aplicação do KBDM está no fato de não precisar corrigir a fase para a quantificação, desde que, cada linha tenha sido ajustada por uma única lorentziana. Como os parâmetros que ajustam os picos são conhecidos, se estes se defasam, a única variação se encontrará nos seus parâmetros de fase. E para a correção de fase, basta anular a fase de cada pico. Se o pico for ajustado por mais de uma lorentziana, para a quantificação precisaremos além das amplitudes complexas dos FIDs.

6 CONCLUSÃO

No que se refere ao KBDM, praticamente todos os procedimentos executados foram capazes de demonstrar a robustez do método. Conforme pudemos notar, o método em si para a geração do espectro não introduziu variações maiores que aquelas observadas pela FT, independente da presença ou não de ruído ou artefatos que prejudiquem o formato lorentziano dos picos, como correntes induzidas. E como foi discutidos, a única diferença, que é a presença de pontos espúrios, pode ser resolvida com a aplicação de filtros que eliminem picos de frequências altas (como também para a redução do ruído). Isso indica que quando há variação entre os espectros de uma mesma amostra e protocolo, ela é intrínseca e característica da reprodutibilidade do equipamento. Desta forma, um de nossos objetivos iniciais foi atingido, uma vez que conseguimos verificar a estabilidade do formalismo e algoritmo do KBDM, tanto para situações ideais (simulações) como em situações reais (experimentos com *phantoms*), nas quais o sinal apresenta certo nível de ruído e artefatos.

Outra característica importante do processamento utilizando o método KBDM é a habilidade de lidar com sinais truncados. Ao graficar a FT de todo o FID simulado, por exemplo, o KBDM conseguia gerar o espectro equivalente ao original com truncamentos do sinal adquirido em até 4% (para os dados sem ruído) e 14% (dados experimentais), sem haver perda de resolução espectral. Embora em um tamanho pouco menor do mencionado a resolução ainda era suficiente para resolver os maiores, e principais picos usados clinicamente, como em 3% do sinal simulado e 12% do experimental. Já a comparação fornecida pela figura 22, nos permitiu visualizar a redução de resolução da curva processada pela FT antes e após o truncamento, respectivamente. Isso mostra que, dependendo da aplicação, ainda que em sinais com ruído, o KBDM é capaz de determinar com acurácia os picos de interesse com muito poucos pontos. Deste modo, conclui-se que o KBDM é uma ferramenta poderosa na otimização da relação resolução espectral/tempo de aquisição o que potencializa a realização de experimentos de espectroscopia que esta característica seja essencial, como os de estudos da dinâmica metabólica.

Além de apresentar uma melhora na resolução, uma vez que não pode ser limitada pelo Relação de Incerteza do formalismo de Fourier, a técnica também amplia as possibilidades de processar o espectro. Por exemplo, ela permite trabalhar independentemente com os picos, basta modificar uma lista de parâmetros das lorentzianas que ajustam o sinal, podendo selecioná-los e excluí-los. Este procedimento pode ser explorado para eliminar

componentes que estejam contribuindo para distorção da linha de base, auxiliando na adequada análise quantitativa do sinal. Aproveitando desta vantagem, demonstramos a possibilidade de retirar de forma fácil, eficiente e precisa, o pico residual da água do espectro, ou ainda, retirar o pico da água em experimentos sem supressão de água. Esta última característica é uma vantagem para estudos de quantificação absoluta.

Com a flexibilidade de trabalhar com a lista de parâmetros dos picos válidos fornecidas pelo método, foi possível, também, fazer a quantificação. Pôde-se selecionar apenas os picos que se encontravam em determinadas faixas de frequência e FWHM, sem precisar conhecer previamente e identificar os demais picos que compõe o espectro, ou tratar as distorções das linhas de base (como geralmente é necessário no AMARES para se obter uma boa acurácia). Além disso, para este método não precisa que sejam identificados todos os picos em sobreposição, como no caso do NAA que estava sobreposto ao GABA, Glx2, NAAG, para quantificar um pico específico de forma acurada.

Dos experimentos, verificou-se que o método é bastante sensível para espectros com níveis de ruído experimentais (isto é, similar ao que encontramos para experimentos de RM em *phantoms* em 2 T), determinando com precisão os principais metabólitos - com desvio menor que 5% para a maioria nas simulações. Embora o KBDM reduza sua eficiência conforme a redução de SNR, ele conseguiu encontrar valores equivalentes de área para todos os níveis de ruídos estudados, como foi listado na tabela 8. Sua aplicação como filtro passa-baixa devido a sua acurácia em trabalhar com FID truncado, figura 41, aumentando o SNR dos experimentos, possivelmente reduz o impacto do ruído na quantificação.

Em MRS, uma das dificuldades imposta pelos métodos tradicionais está associada à adequada quantificação de metabólitos que apresentam multipletos. Isso é particularmente crítico em aplicações clínicas, nas quais os campos magnéticos são tipicamente limitados a 3.0T e o tempo de aquisição limitado pelo custo/minuto de um equipamento de RM. Além disso, quando os dados são adquiridos em pacientes, quanto mais longo o exame, maior a probabilidade de que haja movimento do mesmo, o que compromete diretamente a qualidade dos dados obtidos. O KBDM pode ser uma ferramenta para auxiliar estas dificuldades. Entre possíveis futuros trabalhos, pode-se explorar a manipulação de alguns dos parâmetros das listas, como a redução proporcionalmente dos FWHMs de todos os picos, de forma a conservar a área, permitindo, assim, a identificação dos picos que estão em regiões de sobreposição. Isto seria de extrema importância para a quantificação relativa, por exemplo, de metabólitos que apresentam multipletos. Além disso, há também a possibilidade da quantificação de picos menores completamente encobertos por maiores, como aqueles

próximos a água, se garantirmos a excelência do experimento (o que significa: formas mais aproximadas de linhas lorentzianas para o KBDM resolver adequadamente as componentes espectrais do sinal).

Outro desafio dos experimentos de MRS se encontra na resolução de espectros com tempo total de aquisição comparável ou inferior à variação metabólica funcional. Nossos resultados utilizando dados truncados sugerem que essa dificuldade poderá, muito em breve, ser superada.

Com o aprimoramento constante do método, e, conseqüente crescimento contínuo da estabilidade e eficiência, além das aplicações aqui citadas, outras novas poderão surgir.

REFERÊNCIAS*

- 1 MANDELSHTAM, V. A. FDM: the filter diagonalization method for data processing in NMR experiments. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 38, n. 2, p. 159-196, 2001.
- 2 DAI, B.; EADS, C. D. Efficient removal of unwanted signals in NMR spectra using the filter diagonalization method. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 230-234, 2010.
- 3 MANDELSHTAM, V. A.; HU, H. T.; SHAKA, A. J. Two-dimensional HSQC NMR spectra obtained using a self-compensating double pulsed field gradient and processed using the filter diagonalization method. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 36, p. S17-S28, 1998.
- 4 MANDELSHTAM, V. A.; TAYLOR, H. S. Multidimensional harmonic inversion by filter-diagonalization. **Journal of Chemical Physics**, v. 108, n. 24, p. 9970-9977, 1998.
- 5 GERLACH, W.; STERN, O. The experimental proof of magnetic moment of silver atoms. **Zeitschrift fur Physik**, v. 8, p. 110-111, 1921.
- 6 RABI, I. I. et al. A new method of measuring nuclear magnetic moment. **Physical Review**, v. 53, n. 4, p. 318-318, 1938.
- 7 PURCELL, E. M.; TORREY, H. C.; POUND, R. V. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. **Physical Review**, v. 69, n. 1-2, p. 37-38, 1946.
- 8 BLOCH, F.; HANSEN, W. W.; PACKARD, M. The nuclear induction experiment. **Physical Review**, v. 70, n. 7-8, p. 474-485, 1946.
- 9 BLOCH, F. Nuclear induction. **Physical Review**, v. 70, n. 7-8, p. 460-474, 1946.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

10 LAUTERBUR, P. C. Image formation by induced local interactions - examples employing nuclear magnetic-resonance. **Nature**, v. 242, n. 5394, p. 190-191, 1973.

11 FREITAS, J. C. C.; BONAGAMBA, T. J. **Os núcleos atômicos e a RMN: o modelo de camadas, o spin nuclear e os momentos eletromagnéticos nucleares**. 1999. (Série fundamentos e aplicações da ressonância magnética nuclear, v. 1). Disponível em: <http://www.cce.ufes.br/jair/rmnp1/Nucleos_Atomicos_RMN_JCCFreitas_TJBonagamba.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2013.

12 HAACKE, E. M.; THOMPSON, M. R.; VENKATESAN, R. **Magnetic resonance imaging: physical principles and sequence design**. New York: Wiley-Liss, 1999.

13 BOTTOMLEY, P. A. NMR in Medicine. **Computerized Radiology**, v. 8, n. 2, p. 57-77, 1984.

14 HOULT, D. I. The principle of reciprocity in signal strength calculations - a mathematical guide. **Concepts in Magnetic Resonance**, v. 12, n. 4, p. 173-187, 2000.

15 _____. The principle of reciprocity. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 213, n. 2, p. 344-346, 2011.

16 KAUPPINEN, J. P. **Fourier transforms in spectroscopy**. Berlin: Wiley-VCH, 2001.

17 HAHN, E. L. Spin echoes. **Physical Review**, v. 80, n. 4, p. 580-594, 1950.

18 MOON, R. B.; RICHARDS, J. H. Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 20, p. 7276-8, 1973.

19 ATKINS, T.; PAULA, J. **Atkins' physical chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 2006.

20 PAVIA, D. L. L.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. . **Introduction to spectroscopy**. Belmont: Brooks/Cole, 2009.

21 DE GRAAF, R. A. **In vivo NMR spectroscopy: principles and techniques**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

- 22 STEFAN, D. et al. Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package. **Measurement Science and Technology**, v. 20, n. 10, p. 104035, 2009.
- 23 GOVINDARAJU, V.; YOUNG, K.; MAUDSLEY, A. A. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. **NMR in Biomedicine**, v. 13, n. 3, p. 129-53, 2000.
- 24 CHEN, W. Z. Dynamic study of cerebral bioenergetics and brain function using in vivo multinuclear MRS approaches. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 27A, n. 2, p. 84-121, 2005.
- 25 PFEUFFER, J. et al. Toward an in vivo neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time (1)H NMR spectra of the rat brain. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 141, n. 1, p. 104-120, 1999.
- 26 KIM, D. **Magnetic resonance spectroscopy**. Croácia: InTech, 2012.
- 27 DROST, D. J.; RIDDLE, W. R.; CLARKE, G. D. Proton magnetic resonance spectroscopy in the brain: report of AAPM MR Task Group #9. **Medical Physics**, v. 29, n. 9, p. 2177-2197, 2002.
- 28 FIRBANK, M. J.; HARRISON, R. M.; O'BRIEN, J. T. A comprehensive review of proton magnetic resonance spectroscopy studies in dementia and Parkinson's disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 14, n. 2, p. 64-76, 2002.
- 29 GILLIES, R. J.; MORSEM, D. L. In vivo magnetic resonance spectroscopy in cancer. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 7, p. 287-326, 2005. doi: 10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100411.
- 30 DROST, D. J.; RIDDLE, W. R.; CLARKE, G. D. Proton magnetic resonance spectroscopy in the brain: report of AAPM MR task group #9. **Medical Physics**, v. 29, n. 9, p. 2177-2197, 2002.
- 31 MANDAL, P. K. In vivo proton magnetic resonance spectroscopic signal processing for the absolute quantitation of brain metabolites. **European Journal of Radiology**, v. 81, n. 4, p. e653-664, 2012.
- 32 FRAHM, J.; MERBOLDT, K. D.; HANICKE, W. Localized proton spectroscopy using stimulated echoes. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 72, n. 3, p. 502-508, 1987.

- 33 ORDIDGE, R. J.; CONNELLY, A.; LOHMAN, J. A. B. Image-selected invivo spectroscopy (Isis) - a new technique for spatially selective Nmr-spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 66, n. 2, p. 283-294, 1986.
- 34 TKAC, I. et al. In vivo H-1 NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 41, n. 4, p. 649-656, 1999.
- 35 KLOSE, U. Measurement sequences for single voxel proton MR spectroscopy. **European Journal of Radiology**, v. 67, n. 2, p. 194-201, 2008.
- 36 HAASE, A. et al. 1H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. **Physics in Medicine and Biology**, v. 30, n. 4, p. 341-4, 1985.
- 37 DODDRELL, D. M. et al. Water signal elimination invivo, using suppression by mistimed echo and repetitive gradient episodes. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 70, n. 1, p. 176-180, 1986.
- 38 MESCHER, M. et al. Solvent suppression using selective echo dephasing. **Journal of Magnetic Resonance Series A**, v. 123, n. 2, p. 226-229, 1996.
- 39 PIOTTO, M.; SAUDEK, V.; SKLENAR, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum nmr-spectroscopy of aqueous-solutions. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 2, n. 6, p. 661-665, 1992.
- 40 COHEN, L. **Time-frequency analisis**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1995.
- 41 JIRU, F. Introduction to post-processing techniques. **European Journal of Radiology**, v. 67, n. 2, p. 202-17, 2008.
- 42 MOUNTFORD, C. E. et al. Neurospectroscopy: the past, present and future. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 3060-3086, 2010.
- 43 BRACEWELL, R. N. **The Fourier transform and its applications**. New York: McGraw-Hill, 1986.
- 44 ORDIDGE, R. J.; CRESSHULL, I. D. The correction of transient B0 field shifts following the application of pulsed gradients by phase correction in the time domain. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 69, n. 1, p. 151-155, 1986.

45 JEHENSON, P.; SYROTA, A. Correction of distortions due to the pulsed magnetic-field gradient-induced shift in B₀ field by postprocessing. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 12, n. 2, p. 253-256, 1989.

46 KLOSE, U. In vivo proton spectroscopy in presence of eddy currents. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 14, n. 1, p. 26-30, 1990.

47 MARION, D.; IKURA, M.; BAX, A. Improved solvent suppression in one-dimensional and two-dimensional Nmr-spectra by convolution of time-domain data. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 84, n. 2, p. 425-430, 1989.

48 CORON, A. et al. The filtering approach to solvent peak suppression in MRS: a critical review. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 152, n. 1, p. 26-40, 2001.

49 DEBEER, R. et al. Quantitative-analysis of magnetic-resonance signals in the time domain. **Israel Journal of Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 249-261, 1988.

50 PIJNAPPEL, W. W. F. et al. Svd-based quantification of magnetic-resonance signals. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 97, n. 1, p. 122-134, 1992.

51 VANHAMME, L. et al. Fast removal of residual water in proton spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 132, n. 2, p. 197-203, 1998.

52 CABANES, E. et al. Optimization of residual water signal removal by HLSVD on simulated short echo time proton MR spectra of the human brain. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 150, n. 2, p. 116-125, 2001.

53 BEHAR, K. L. et al. Analysis of macromolecule resonances in ¹H NMR spectra of human brain. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 32, n. 3, p. 294-302, 1994.

54 HWANG, J. H. et al. Short echo time proton magnetic resonance spectroscopic imaging of macromolecule and metabolite signal intensities in the human brain. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 35, n. 5, p. 633-639, 1996.

55 OPSTAD, K. S. et al. Differentiation of metastases from high-grade gliomas using short echo time ¹H spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 20, n. 2, p. 187-192, 2004.

56 SEEGER, U. et al. Parameterized evaluation of macromolecules and lipids in proton MR spectroscopy of brain diseases. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 49, n. 1, p. 19-28, 2003.

57 BARTHA, R.; DROST, D. J.; WILLIAMSON, P. C. Factors affecting the quantification of short echo in-vivo ^1H MR spectra: prior knowledge, peak elimination, and filtering. **NMR in Biomedicine**, v. 12, n. 4, p. 205-16, 1999.

58 MEYER, R. A. et al. Evaluation of manual methods for integration of in vivo phosphorus NMR spectra. **NMR in Biomedicine**, v. 1, n. 3, p. 131-135, 1988.

59 BOURG, S.; NUZILLARD, J. M. Influence of noise on peak integrals obtained by direct summation. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 134, n. 1, p. 184-188, 1998.

60 VANHAMME, L. et al. MR spectroscopy quantitation: a review of time-domain methods. **NMR in Biomedicine**, v. 14, n. 4, p. 233-246, 2001.

61 ABILDGAARD, F.; GESMAR, H.; LED, J. J. Quantitative-analysis of complicated nonideal Fourier-transform Nmr-spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 79, n. 1, p. 78-89, 1988.

62 DE GRAAF, A. A.; BOVEE, W. M. Improved quantification of in vivo ^1H NMR spectra by optimization of signal acquisition and processing and by incorporation of prior knowledge into the spectral fitting. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 15, n. 2, p. 305-319, 1990.

63 YOUNG, K.; SOHER, B. J.; MAUDSLEY, A. A. Automated spectral analysis II: application of wavelet shrinkage for characterization of non-parameterized signals. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 40, n. 6, p. 816-21, 1998.

64 HILTUNEN, Y. et al. A lineshape fitting model for ^1H NMR spectra of human blood plasma. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 21, n. 2, p. 222-32, 1991.

65 PROVENCHER, S. W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 30, n. 6, p. 672-679, 1993.

66 OSBORNE, M. **Numerical methods for non-linear optimization**. London: Academic Press, 1972.

- 67 MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. **Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics**, v. 11, n. 2, p. 431-441, 1963.
- 68 MIERISOVA, S.; ALA-KORPELA, M. MR spectroscopy quantitation: a review of frequency domain methods. **NMR in Biomedicine**, v. 14, n. 4, p. 247-59, 2001.
- 69 VANHAMME, L. et al. Frequency-selective quantification of biomedical magnetic resonance spectroscopy data. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 143, n. 1, p. 1-16, 2000.
- 70 POULLET, J. B. et al. An automated quantitation of short echo time MRS spectra in an open source software environment: AQSES. **NMR in Biomedicine**, v. 20, n. 5, p. 493-504, 2007.
- 71 VANHAMME, L.; VAN DEN BOOGAART, A.; VAN HUFFEL, S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 129, n. 1, p. 35-43, 1997.
- 72 ELSTER, C. et al. Quantitative magnetic resonance spectroscopy: semi-parametric modeling and determination of uncertainties. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 53, n. 6, p. 1288-1296, 2005.
- 73 RATINEY, H. et al. Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. **NMR in Biomedicine**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2005.
- 74 VAN DER VEEN, J. W. et al. Accurate quantification of in vivo ^{31}P NMR signals using the variable projection method and prior knowledge. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 6, n. 1, p. 92-98, 1988.
- 75 MIERISOVA, S. et al. New approach for quantitation of short echo time in vivo ^1H MR spectra of brain using AMARES. **NMR in Biomedicine**, v. 11, n. 1, p. 32-39, 1998.
- 76 THOMPSON, R. B.; ALLEN, P. S. Sources of variability in the response of coupled spins to the PRESS sequence and their potential impact on metabolite quantification. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 41, n. 6, p. 1162-1169, 1999.
- 77 DE BEER, R. et al. Quality assessment in in vivo NMR spectroscopy: VI. multicentre quantification of MRS test signals. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 13, n. 1, p. 169-76, 1995.

78 HENRIKSEN, O. In vivo quantitation of metabolite concentrations in the brain by means of proton MRS. **NMR in Biomedicine**, v. 8, n. 4, p. 139-148, 1995.

79 STANLEY, J. A. et al. The use of a priori knowledge to quantify short echo in vivo ¹H MR spectra. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 34, n. 1, p. 17-24, 1995.

80 VAN DEN BOOGAART, A. et al. In vivo ³¹P MRS: absolute concentrations, signal-to-noise and prior knowledge. **NMR in Biomedicine**, v. 8, n. 2, p. 87-93, 1995.

81 STOICA, P. et al. Using prior knowledge in SVD-based parameter estimation for magnetic resonance spectroscopy--the ATP example. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 51, n. 9, p. 1568-78, 2004.

82 POULLET, J. B.; SIMA, D. M.; VAN HUFFEL, S. MRS signal quantitation: a review of time- and frequency-domain methods. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 195, n. 2, p. 134-44, 2008.

83 KAARTINEN, J. et al. Automated quantification of human brain metabolites by artificial neural network analysis from in vivo single-voxel H-1 NMR spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 134, n. 1, p. 176-179, 1998.

84 HILTUNEN, Y. et al. Quantification of human brain metabolites from in vivo H-1 NMR magnitude spectra using automated artificial neural network analysis. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 154, n. 1, p. 1-5, 2002.

85 STOYANOVA, R.; KUESEL, A. C.; BROWN, T. R. Application of principal-component analysis for nmr spectral quantitation. **Journal of Magnetic Resonance Series A**, v. 115, n. 2, p. 265-269, 1995.

86 NARESSI, A. et al. Java-based graphical user interface for MRUI, a software package for quantitation of in vivo/medical magnetic resonance spectroscopy signals. **Computers in Biology and Medicine**, v. 31, n. 4, p. 269-286, 2001.

87 NARESSI, A. et al. Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package. **Magnetic Resonance Materials in Physics Biology and Medicine**, v. 12, n. 2-3, p. 141-152, 2001.

88 SLOTBOOM, J.; BOESCH, C.; KREIS, R. Versatile frequency domain fitting using time domain models and prior knowledge. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 39, n. 6, p. 899-911, 1998.

89 KANOWSKI, M. et al. Quantitation of simulated short echo time ^1H human brain spectra by LCModel and AMARES. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 51, n. 5, p. 904-912, 2004.

90 HOFMANN, L. et al. Quantitative ^1H -magnetic resonance spectroscopy of human brain: influence of composition and parameterization of the basis set in linear combination model-fitting. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 48, n. 3, p. 440-453, 2002.

91 PROVENCHER, S. W. Automatic quantitation of localized in vivo ^1H spectra with LCModel. **NMR in Biomedicine**, v. 14, n. 4, p. 260-264, 2001.

92 NEUHAUSER, D. Bound state eigenfunctions from wave packets: time–energy resolution. **Journal of Chemical Physics**, v. 93 p. 2611–2616, 1990. doi: 10.1063/1.458900

93 WALL, M. R.; NEUHAUSER, D. Extraction, through filter-diagonalization, of general quantum eigenvalues or classical normal-mode frequencies from a small number of residues or a short-time segment of a signal. 1. theory and application to a quantum-dynamics model. **Journal of Chemical Physics**, v. 102, n. 20, p. 8011-8022, 1995.

94 MANDELSHTAM, V. A. T. Spectral analysis of time correlation function for a dissipative dynamical system using filter diagonalization: application to calculation of unimolecular decay rates. **Physical Review Letters**, v. 78, n. 17, p. 3274-3277, 1997.

95 MANDELSHTAM, V. A.; TAYLOR, H. S. Harmonic inversion of time signals and its applications. **Journal of Chemical Physics**, v. 107, n. 17, p. 6756-6769, 1997.

96 MAGON, C. J. **A inversão harmônica do espectro de ressonância magnética : uma solução para o problema dos autocampos**. 2011. 140 p. Livre Docência (Livre Docência) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

97 MORAES, T. B. **O método da diagonalização filtrada (FDM) e suas aplicações para a Ressonância Magnética**. 2011. 100 p. Mestrado (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

98 SARCHIELLI, P. et al. Functional ^1H -MRS findings in migraine patients with and without aura assessed interictally. **NeuroImage**, v. 24, n. 4, p. 1025-31, 2005.

99 URRILA, A. S. et al. Preliminary findings of proton magnetic resonance spectroscopy in occipital cortex during sleep deprivation. **Psychiatry Research**, v. 147, n. 1, p. 41-6, 2006.

100 BASLOW, M. H.; HRABE, J.; GUILFOYLE, D. N. Dynamic relationship between neurostimulation and N-acetylaspartate metabolism in the human visual cortex: evidence that NAA functions as a molecular water pump during visual stimulation. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 32, n. 3, p. 235-45, 2007.

101 CASTELLANO, G. et al. NAA and NAAG variation in neuronal activation during visual stimulation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 11, p. 1031-1036, 2012.

102 STEFAN, D. et al. Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package. **Measurement Science & Technology**, v. 20, n. 10, 2009. doi:10.1088/0957-0233/20/10/104035.

103 TORRIANI, M. et al. Intramyocellular lipid quantification: repeatability with ¹H MR spectroscopy. **Radiology**, v. 236, n. 2, p. 609-614, 2005.

104 GOTTSCHALK, M.; LAMALLE, L.; SEGEBARTH, C. Short-TE localised ¹H MRS of the human brain at 3 T: quantification of the metabolite signals using two approaches to account for macromolecular signal contributions. **NMR in Biomedicine**, v. 21, n. 5, p. 507-517, 2008.

105 WANG, L. et al. Relaxation times of skeletal muscle metabolites at 7T. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 29, n. 6, p. 1457-1464, 2009.

106 VAN HEESWIJK, R. B. et al. Quantification of brain glycogen concentration and turnover through localized ¹³C NMR of both the C1 and C6 resonances. **NMR in Biomedicine**, v. 23, n. 3, p. 270-276, 2010.

107 CUELLAR-BAENA, S. et al. Manual and semi-automatic quantification of in vivo (1)H-MRS data for the classification of human primary brain tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 4, p. 345-353, 2011.

108 O'GORMAN, R. L. et al. In vivo detection of GABA and glutamate with MEGA-PRESS: reproducibility and gender effects. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 33, n. 5, p. 1262-1267, 2011.

109 RASCHPICHLER, M. C. et al. Evaluating childhood obesity: magnetic resonance-based quantification of abdominal adipose tissue and liver fat in children. **RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin**, v. 184, n. 4, p. 324-332, 2012.

110 BAKER, E. H. et al. Regional apparent metabolite concentrations in young adult brain measured by (1)H MR spectroscopy at 3 Tesla. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 27, n. 3, p. 489-499, 2008.

111 POUWELS, P. J. W.; FRAHM, T. Regional metabolite concentrations in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 39, n. 1, p. 53-60, 1998.

112 PROVENCHER, S. **LC model and LC Mgui user's manual**. Disponível em: <<http://s-provencher.com/pub/LCModel/manual/manual.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2012.

113 PAPOTI, D. **Desenvolvimento de bobinas de RF transmissoras e receptoras do tipo phased arrays para experimentos de imagens por ressonância magnética em ratos**. 2011. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

114 MARIA, R. M. et al. Processing of high resolution magic angle spinning spectra of breast cancer cells by the filter diagonalization method. **Analyst**, v. 137, n. 19, p. 4546-4551, 2012.

115 TRABER, F. et al. A multicenter reproducibility study of single-voxel 1H-MRS of the medial temporal lobe. **European Radiology**, v. 16, n. 5, p. 1096-1103, 2006.

116 LI, Y. et al. Three-dimensional J-resolved H-1 magnetic resonance spectroscopic imaging of volunteers and patients with brain tumors at 3T. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 58, n. 5, p. 886-892, 2007.

117 SHIH, Y. Y. et al. Vitamin C estimation with standard (1)H spectroscopy using a clinical 3T MR system: detectability and reliability within the human brain. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 28, n. 2, p. 351-358, 2008.

118 VAN DER GRAAF, M. et al. MRS quality assessment in a multicentre study on MRS-based classification of brain tumours. **NMR in Biomedicine**, v. 21, n. 2, p. 148-58, 2008.

119 BERNABEU, A. et al. Proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) reveals the presence of elevated myo-inositol in the occipital cortex of blind subjects. **NeuroImage**, v. 47, n. 4, p. 1172-6, 2009.

120 HANCU, I. Which pulse sequence is optimal for myo-inositol detection at 3T? **NMR in Biomedicine**, v. 22, n. 4, p. 426-35, 2009.